

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie

der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

**Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum
von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien
und
Bedeutung des IGF Bindungs-Protein 3**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Carsten-Henning Ohlmann
aus Wesel

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am
28.11.2002, gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: PD Dr. G. Jaques
Correferent: Prof. Dr. F. Czubayko

Meinen Eltern

Gliederung

I. Einleitung

| | | |
|-------|---|----|
| I.1 | Das Bronchialkarzinom | 4 |
| I.1.1 | Klassifizierung und Epidemiologie | 4 |
| I.1.2 | Das kleinzellige Bronchialkarzinom | 5 |
| I.1.3 | Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom | 6 |
| I.2 | Retinoide | 7 |
| I.2.1 | Definition, Wirkung und Signalweg der Retinoide | 7 |
| I.2.2 | Chemoprävention und Therapie mit Retinoiden | 8 |
| I.3 | Fenretinid | 10 |
| I.3.1 | Charakterisierung und Metabolismus | 10 |
| I.3.2 | Chemoprävention und Therapie mit Fenretinid | 11 |
| I.4 | Das IGF-System | 12 |
| I.4.1 | Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) | 12 |
| I.4.2 | IGF Bindungs-Proteine (IGFBP's) | 13 |
| I.5 | Ziel der Arbeit | 14 |

II. Material und Methoden

| | | |
|----------|---|----|
| II.1 | Material | 16 |
| II.1.1 | Geräte | 16 |
| II.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 17 |
| II.1.3 | Chemikalien, Lösungen, Medien | 17 |
| II.1.4 | Kits | 18 |
| II.1.5 | Antikörper | 18 |
| II.1.6 | Enzyme | 18 |
| II.1.7 | Nukleinsäuren, Nukleotide und Primer für die RT-PCR | 19 |
| II.1.8 | Hergestellte Lösungen und Medien | 19 |
| II.2 | Methoden | 22 |
| II.2.1 | Bronchialkarzinomzell-Linien | 22 |
| II.2.2 | Zellkultur | 22 |
| II.2.3 | Wachstumsversuche | 23 |
| II.2.4 | TUNEL-Assay | 24 |
| II.2.5 | Messung der IGFBP-3 Konzentration mittels ELISA | 25 |
| II.2.5.1 | Konditionierung der Zellkulturmedien | 25 |
| II.2.5.2 | Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) | 25 |

| | | |
|-------------|--|----|
| II.2.6 | Immunzytochemie | 26 |
| II.2.7 | IGFBP-3 mRNA-Analysen | 27 |
| II.2.7.1 | RNA-Extraktion aus Zellen | 27 |
| II.2.7.2 | Herstellung der cDNA | 28 |
| II.2.7.3 | Polymerase-Kettenreaktion PCR | 28 |
| II.2.8 | Statistische Auswertung | 29 |
| III. | Ergebnisse | |
| III.1 | Wachstum der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien unter Fenretinid | 30 |
| III.2 | Vergleich der Wirkung von Fenretinid und All- <i>trans</i> -Retinsäure | 32 |
| III.3 | Wachstumskinetiken unter Fenretinid und All- <i>trans</i> -Retinsäure | 33 |
| III.4 | Reversibilität der Wachstumshemmung von Fenretinid und All- <i>trans</i> -Retinsäure | 35 |
| III.5 | Wachstumshemmung durch Fenretinid in Abhängigkeit verschiedener Zellkultur-Bedingungen | 39 |
| III.5.1 | Medientausch | 39 |
| III.5.2 | Variation der Zellzahl | 40 |
| III.6 | Wachstum und Morphologie der Zellen unter Fenretinid und All- <i>trans</i> -Retinsäure in Abhängigkeit vom Zellkultur-Medium | 41 |
| III.7 | Langzeitstimulation mit Fenretinid und All- <i>trans</i> -Retinsäure | 43 |
| III.8 | Apoptoseinduktion durch Fenretinid und All- <i>trans</i> -Retinsäure | 44 |
| III.9 | IGFBP-3 Konzentration in konditionierten Medien | 46 |
| III.10 | Immunzytochemische Färbung von IGFBP-3 | 47 |
| III.11 | mRNA-Expression von IGFBP-3 | 50 |
| IV. | Diskussion | 52 |
| IV.1 | Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomzell-Linien | 53 |
| IV.1.1 | Wachstumshemmung durch Fenretinid | 53 |
| IV.1.2 | Reversibilität der Wachstumshemmung | 56 |
| IV.2 | Mechanismus der Wachstumshemmung durch Fenretinid | 57 |
| IV.2.1 | Bedeutung der RAR β -Induktion für die Wachstumshemmung durch Fenretinid | 59 |

| | | |
|--------------|---|----|
| IV.2.2 | Modell des IGFBP-3 Signalweges | 60 |
| IV.2.3 | Apoptose | 62 |
| IV.3 | Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Anwendung von Fenretinid | 65 |
| V. | Zusammenfassung | 67 |
| VI. | Abkürzungen | 69 |
| VII. | Literaturverzeichnis | 70 |
| VIII. | Anhang | 81 |

I. Einleitung

I.1 Das Bronchialkarzinom

I.1.1 Klassifizierung und Epidemiologie

Die humanen Bronchialkarzinome werden histopathologisch in die nicht-kleinzelligen (NSCLC, ca. 75-80%) und die kleinzelligen (SCLC, ca. 20-25%) Bronchialkarzinome unterteilt. Zu den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen werden das Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom und das großzellige Karzinom gerechnet. Der Einteilung in kleinzellige und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome kommt eine entscheidende Rolle für die weitere Diagnostik, Therapie und Prognose zu (Laack et al. 2000).

Insgesamt ist ein Rückgang der Inzidenzen von Krebserkrankungen zum Ende der 90'er Jahre in den USA festzustellen. Grund dafür ist vor allem der Rückgang der Tabak-assoziierten Tumore und hier insbesondere des Bronchialkarzinoms (McKean-Cowdin et al. 2000). Nach Schätzungen für das Jahr 2001 ist das Bronchialkarzinom hinter dem Prostata-Karzinom und dem Mamma-Karzinom auf Platz 3 der häufigsten Tumor-Inzidenzen in den USA zurückgefallen (American Cancer Society et al. 2001). Wegen der allgemein schlechten Prognose bleiben die Bronchialkarzinome aber mit Abstand die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen. Auch in Deutschland ist ein Rückgang der Mortalitätsraten beim Bronchialkarzinom zu verzeichnen. Allerdings ist zu beachten, dass die Inzidenz und Mortalität bei Männern seit Beginn der 80'er Jahre rückläufig sind, während bei Frauen die Inzidenz weiter ansteigt (Robert-Koch-Institut et al. 2000, Deutsches Krebsforschungszentrum et al. 2000). Zurückzuführen ist dieser Wandel auf den steigenden Zigarettenkonsum von Frauen bei einer sinkenden Tendenz bei Männern. Alarmierend ist die Steigerung des Zigarettenkonsums der jüngeren Generationen und hier vor allem der jungen Frauen zu betrachten. Ein erneuter Anstieg der Zahl an Bronchialkarzinomen zeichnet sich ab (Center for Disease Control and Prevention et al. 2000, Bundesministerium für Gesundheit et al. 2000).

1.1.2 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

Das kleinzellige Bronchialkarzinom zeichnet sich durch eine hohe Proliferationsrate und eine frühzeitige Disseminationstendenz aus. Mit Hinblick auf die Therapie wurde das kleinzellige Bronchialkarzinom von der Veterans Administration Lung Cancer Study Group (VALG) vereinfacht in zwei klinische Stadien unterteilt (Zelen et al. 1973). Dabei wird zwischen dem Stadium der „limited disease“, das auf den Hemithorax beschränkt ist, und dem Stadium der „extensive disease“ mit schon weitergehender Metastasierung unterschieden. Diese Einteilung wird in Zukunft von der Einteilung nach dem TNM-System abgelöst werden, um die Patienten besser nach ihrer Prognose unterscheiden zu können (Sobin et al. 1997, Deutsche Krebsgesellschaft et al. 2000).

Im Stadium „limited disease“ besteht in der Regel ein kurativer Therapieansatz. Bei begrenzter Tumorausdehnung (Stadium TI/II nach UICC) besteht die Therapie in einer primären Operation mit nachfolgender adjuvanter Chemotherapie. Bei Vorliegen von Lymphknoten-Metastasen wird eine konsolidierende Radiotherapie durchgeführt. Darüber hinaus kann bei kompletter Remission eine prophylaktische Hirnbestrahlung erwogen werden.

Im weiter fortgeschrittenen Stadium der „limited disease“ (Stadium III A oder III B nach UICC) wird unmittelbar nach Stellen der Diagnose eine Chemotherapie eingeleitet. Darauf folgen eine konsolidierende Radiotherapie sowie die prophylaktische Hirnbestrahlung.

Im Stadium „extensive disease“ (Stadium IV nach UICC) besteht kein kurativer Therapieansatz mehr. Bei Diagnose eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms fallen >60 % der Patienten in dieses Stadium, die mit Chemotherapie und Radiotherapie der Metastasen in palliativer Absicht therapiert werden (Deutsche Krebsgesellschaft et al. 2000). Die Prognose der Patienten mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom liegt bei einer mittleren Überlebenszeit von 3 - 5 Monaten und einer 1-Jahres-Überlebensrate von etwa 4%.

1.1.3 Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom

Zur besseren Übersicht ist die Stadieneinteilung nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms in Tabelle 1 zusammengefasst (Sobin et al. 1997). Bei Diagnosestellung liegt bei ca. 23% der Patienten ein lokal begrenztes Tumorstadium (I/II) vor. 44% der Patienten haben bereits ein lokal fortgeschrittenes Stadium (III A/B) und 33% der Patienten weisen ein fernmetastasiertes Stadium vor (Laack et al. 2000).

| Stadium | Primärtumorstatus | Lymphknotenstatus | Metastasierungsstatus |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Okkult | Tx | N0 | M0 |
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I A | T1 | N0 | M0 |
| B | T2 | N0 | M0 |
| Stadium II A | T1 | N1 | M0 |
| B | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Stadium III A | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| B | jedes T | N3 | M0 |
| | T4 | jedes N | M0 |
| Stadium IV | jedes T | jedes N | M1 |

Tab. 1: Stadieneinteilung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach dem TNM-System (T=Tumorgröße, N=Nodulus, M=Fernmetastasen)

Die derzeitige Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms hängt vom klinischen Stadium bei Diagnosestellung ab. Die Operation mit radikaler Entfernung des Tumors und der mediastinalen Lymphknotendissektion stellt die Standardtherapie für das lokal begrenzte Tumorstadium (I/II) sowie für T3N1 Tumore dar (Laack et al. 2000). Bei Inoperabilität der Stadien I und II kann auch die Strahlentherapie mit kurativer Zielsetzung eingesetzt werden. Kombinierte Strahlen- und Chemotherapien werden bei den Tumorstadien III und IV eingesetzt. Die 5-Jahres-Überlebensrate der einzelnen Stadien nach Therapie liegt im Stadium I bei 50-75%, beim Stadium II

30-50% und beim T3N1 Tumoren 30-40%. Für alle übrigen Patienten im Stadium III A mit einem Lymphknotenstatus N2 liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 15% und fällt bei einem Stadium III B auf 5% ab.

I.2 Retinoide

1.2.1 Definition, Wirkung und Signalweg der Retinoide

Die Gruppe der Retinoide umfasst das Vitamin A und seine natürlichen und synthetischen Derivate. Allen gemeinsam ist die Bindung an Retinoid-Rezeptoren im Zellkern. Retinoide sind essentiell für eine Vielzahl physiologischer Vorgänge wie die Proliferation und Differenzierung von Geweben, Immunmodulation und Embryonalentwicklung (Evans et al. 1988, Bollag et al. 1996). Vor allem in der Entwicklung der Lunge spielen Retinoide eine wichtige Rolle. Bereits 1925 konnten Veränderungen in der Form einer keratinisierten Metaplasie des Lungengepithels bei Ratten festgestellt werden, denen Vitamin A aus der Nahrung entzogen wurde. Gabe von Retinoiden konnte diese Metaplasien rückgängig machen (Wolbach et al. 1933). Von den natürlich vorkommenden Retinoiden kommt in der Embryonalentwicklung der Lunge der All-*trans*-Retinsäure (ATRA), welches den Hauptmetaboliten des Vitamin A im menschlichen Körper darstellt, die bedeutendste Rolle zu (Chytil et al. 1996). Nicht nur für die Embryonalentwicklung der Lunge, sondern auch in der Karzinogenese der Bronchialkarzinome sind Retinoide von Bedeutung. Dabei werden Veränderungen im Signalweg der Retinoide als eine Ursache für die Entwicklung von Bronchialkarzinomen angesehen (Willett et al. 1984, Gebert et al. 1991, Geradts et al. 1993).

Retinoide entfalten ihre Wirkung entweder durch Bindung an Rezeptoren im Kern der Zellen oder durch direkte Retinoylierung von Proteinen. Spezifische Retinoid-Rezeptoren wurden erstmals von Giguère (Giguere et al. 1987) und Petkovich (Petkovich et al. 1987) beschrieben. Die Retinoid-Rezeptoren gehören zur großen Familie der Steroid/Thyroid-Hormon-Rezeptoren, die durch Liganden aktiviert die Transkription von Genen regulieren (Evans et al. 1988). Bis heute sind zwei Gruppen von spezifischen Retinoid-Rezeptoren identifiziert worden. Die Retinoic-Acid-Receptors (RAR's) und die Retinoid-X-Receptors (RXR's) werden in drei Subtypen

unterteilt, die mit α , β , und γ bezeichnet werden. In normalem Lungengewebe als auch in Bronchialkarzinomzell-Linien konnte die Expression der Rezeptoren bereits gezeigt werden (Nervi et al. 1991). Die Rezeptoren bilden Homo- oder Heterodimere (RAR/RXR), die dann an Segmente der DNS, so genannte Response-Elements (RARE), am 5' Ende der Gene binden (Chytil et al. 1990, Vista-Picard et al. 1996). Die RXR's bilden darüber hinaus auch Heterodimere mit anderen Rezeptoren der Steroid-Rezeptor-Superfamilie und haben die Fähigkeit, die Aktivität anderer Liganden und Rezeptoren dieser Familie zu modulieren (Mukherjee et al. 1997). Die verschiedenen Retinoide weisen unterschiedliche Affinitäten zu den Rezeptoren auf. Während die All-trans-Retinsäure nur an RAR's bindet, werden sowohl die RAR's als auch die RXR's durch 9-cis-Retinsäure aktiviert. Des Weiteren interagieren die Rezeptoren direkt mit dem Transkriptionsfaktor AP-1, dessen Aktivität sie hemmen (Pfahl et al. 1993).

1.2.2 Chemoprävention und Therapie mit Retinoiden

Bereits 1976 erkannten Sporn et al. (Sporn et al. 1976) den möglichen Nutzen der Retinoide in der Chemoprävention epithelialer Tumore durch die natürliche Funktion der Retinoide für die Differenzierung und Proliferation von Zellen. In vielen experimentellen Modellen der Karzinogenese konnte eine Wirkung pharmakologischer Konzentrationen von Retinoiden in der Chemoprävention verschiedener Tumore in Tieren gezeigt werden, die karzinogenen Substanzen ausgesetzt waren (Moon et al. 1989). In epidemiologischen Studien konnte bereits eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Aufnahme von Vitamin A und der Inzidenz maligner Erkrankungen demonstriert werden (Hong et al. 1994). Darüber hinaus konnte in Studien an Patienten mit präkanzerösen Läsionen epithelialer Tumore eine Rückbildung der Atypien und ein Rückgang der Inzidenzen verzeichnet werden (Lotan et al. 1996). Auch an Lungengewebe wurden die Retinoide untersucht. Die Ergebnisse der Studien mit verschiedenen chemischen Karzinogenen und Tiermodellen sind in der Aussage der Effektivität der Retinoide für die Chemoprävention uneinheitlich (Moon et al. 1994). Die Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien sind in Tabelle 2 dargestellt.

| Substanz | Endpunkt | Fallzahl | Ergebnis | Autor |
|------------------------------------|-------------------|----------|------------|----------------------------|
| Etrenitat | Metaplasie | 150 | Negativ | (Arnold et al. 1992) |
| 13-Cis-Retinsäure | Metaplasie | 87 | Negativ | (Lee et al. 1994) |
| Fenretinid | Metaplasie | 68 | Negativ | (Kurie et al. 1999) |
| Vitamin B ₁₂ + Folsäure | Sputum-Atypie | 73 | Negativ | (Heimbürger et al. 1988) |
| β-Carotin + Retinol | Sputum-Atypie | 755 | Negativ | (McLarty et al. 1995) |
| β-Carotin | Bronchialkarzinom | 29.133 | Schädigend | ¹ |
| Vitamin E | Bronchialkarzinom | 29.133 | Negativ | ¹ |
| β-Carotin + Retinol | Bronchialkarzinom | 18.314 | Schädigend | (Omenn et al. 1996) |
| Retinyl-Palmitat | SPT ² | 307 | Positiv | (Pastorino et al. 1993) |
| Retinyl-Palmitat | SPT | 2.592 | Negativ | (Van Sandwijk et al. 1999) |
| N-acetylcystein | SPT | 2.592 | Negativ | (Van Sandwijk et al. 1999) |

Tab. 2: Klinische Studien mit Retinoiden (¹=(The Alpha-Tocopherol et al. 1994),
²SPT=Second Primary Tumor)

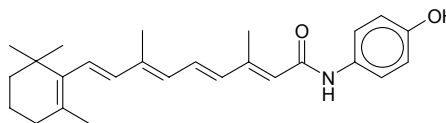
In drei Studien konnte nicht gezeigt werden, dass Retinoide Metaplasien des Bronchialepithels umkehren können (Arnold et al. 1992, Lee et al. 1994, Kurie et al. 1999). Auch bei Sputum-Atypien konnte keine Wirkung von Retinoiden nachgewiesen werden (Heimbürger et al. 1988, McLarty et al. 1995). Neben den Studien an Präkanzerosen gibt es zwei abgeschlossene Studien des National Cancer Institutes (NCI) mit dem Bronchialkarzinom als Endpunkt. Die erste Studie war die α-Tocopherol, β-Carotene Prevention Study (ATBP) (The Alpha-Tocopherol et al. 1994). In dieser randomisierten Studie an starken Rauchern wurden die Teilnehmer entweder mit β-Carotin, α-Tocopherol, der Kombination aus beiden oder einem Placebo über 5-8 Jahre behandelt. Dabei wurde ein signifikanter Anstieg der Inzidenz und der Mortalität der Bronchialkarzinome in der Gruppe der ausschließlich mit β-Carotin behandelten Teilnehmer festgestellt. Die zweite Studie mit β-Carotin und Retinol (CARET-Studie) musste vorzeitig beendet werden, da in der β-Carotin Gruppe ebenfalls die Inzidenz und Mortalität der Bronchialkarzinome signifikant angestiegen waren (Omenn et al. 1996). Viel versprechend waren hingegen die Ergebnisse einer kleineren Studie an Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium I mit dem Endpunkt der Minderung an Second Primary Tumors (SPT). Hier zeigte sich eine signifikant niedrigere Rate von 37% in der Gruppe der mit Retinyl-Palmitat behandelten Teilnehmer gegenüber 48% in der Kontroll-Gruppe (Pastorino et al. 1993). Diese Ergebnisse konnten in einer größeren Studie, der Euroscan-Studie, nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich auch hier keine Wirkung

von Retinyl-Palmitat in der Prävention von Second Primary Tumors (Van Sandwijk et al. 1999). In einer weiteren Phase III-Studie an Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium I konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der mit Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure) und der mit einem Placebo behandelten Gruppe im Hinblick auf die Rezidivrate, Zweit-Tumoren und Mortalität festgestellt werden. In der sekundär durchgeführten Multivariaten- und Subset-Analyse konnte allerdings ein signifikanter Anstieg der Rezidivrate und Mortalität in der Gruppe der Raucher verglichen mit der Gruppe der Patienten, die niemals geraucht hatten, festgestellt werden (Lippman et al. 2001).

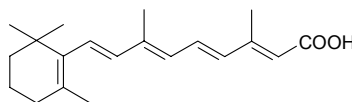
I.3 Fenretinid

I.3.1 Charakterisierung und Metabolismus

Fenretinid



All-*trans*-Retinsäure



N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR, Fenretinid) ist ein synthetisches Amid der All-*trans*-Retinsäure, dessen Synthese erstmals 1978 in einem Patent von Gander und Gurney beschrieben wurde (Gander et al. 1978). Im Körper wird Fenretinid an Albumin gebunden transportiert (Davis et al. 1993). Stoffwechselaktiv ist Fenretinid nur in der freien Form. Fenretinid wird hauptsächlich zu dem lipophilen N-(4-methoxyphenyl)-all-*trans*-retinamide (MPR) metabolisiert. MPR akkumuliert in Geweben wie Fett, Prostata, Skelett-Muskel, Leber und Intestinum. Daneben wird Fenretinid zu polaren Retinamiden abgebaut, die sowohl renal als auch mit der Galle ausgeschieden werden (Swanson et al. 1981). Fenretinid selbst akkumuliert nicht in der Leber, was eine reduzierte Lebertoxizität zur Folge hat. Außerdem reichert sich Fenretinid im Brustdrüsen-Gewebe an (Moon et al. 1979).

1.3.2 Chemoprävention und Therapie mit Fenretinid

Die Wirksamkeit von Fenretinid in der Chemoprävention wurde erstmals 1979 für die Karzinogenese des Mamma-Karzinoms gezeigt (Moon et al. 1979). Auch die Inzidenz von Haut-, Lungen-, Blasen- und Prostata-Tumoren bei Karzinogen-behandelten Nagetieren konnte durch Fenretinid gesenkt werden (Moon et al. 1989). Darüber hinaus wird über die Rückbildung solider Tumore der Mamma durch Fenretinid berichtet (Dowlathshahi et al. 1989, Abou-Issa et al. 1989). Des Weiteren ist Fenretinid wirksam bei in Ratten transplantierten Prostata-Karzinom-Zellen (Pienta et al. 1993). Auch gegenüber Ovarial-Karzinom-Zellen, die in Mäuse transplantiert wurden, erweist sich Fenretinid als wirksam (Formelli et al. 1993b). Entgegen dieser viel versprechenden Ergebnisse konnte Fenretinid die chemisch induzierte Karzinogenese von Prostata-Tumoren in Wistar-Unilever Ratten nicht wirksam verhindern (McCormick et al. 1998). Auch auf die Tumor-Bildung in der Lunge von weiblichen A/J Mäusen, in denen die Karzinogenese chemisch mit Tabak-Nitrosaminen induziert worden war, hatte Fenretinid keinen Einfluss (Conaway et al. 1998). Neben der isolierten Wirkung zeigt sich Fenretinid in Kombination mit anderen Substanzen als synergistisch und kann die Effektivität dieser Substanzen erhöhen. Dazu gehört zum einen die Potenzierung der Wirkung von Cisplatin gegenüber Ovarial-Karzinom Zellen (Formelli et al. 1993b). Daneben erhöht Fenretinid die Wirksamkeit in Kombination mit Tamoxifen beim Mamma-Karzinom sowohl in Zell-Linien (Coradini et al. 1997), als auch *in vivo* bei MNU-induzierten Adenokarzinomen in Ratten (Moon et al. 1992). Diese Kombination zeigt sich auch wirksamer als die Einzelkomponenten allein in der Wachstumshemmung von humanen Darm-Krebs Zellen *in vitro* (Ziv et al. 1994). In einer ersten klinischen Studie an 82 Rauchern mit Plattenepithel-Metaplasie oder – Dysplasie des Bronchialepithels konnte keine Wirkung von Fenretinid bei der Rückbildung der Metaplasien, Dysplasien oder den genetischen und phänotypischen Veränderungen nachgewiesen werden (Kurie et al. 2000). Die Ergebnisse einer großen Studie mit Fenretinid zur Vermeidung eines Zweit-Tumors bei Patientinnen mit einem Mamma-Karzinom im Stadium I nach chirurgischer Therapie werden unterschiedlich interpretiert. Die Patientinnen erhielten über 5 Jahre entweder 200 mg Fenretinid pro Tag oder ein Placebo. Fenretinid konnte dabei die Rate kontra- oder ipsilateraler Zweit-Tumore nicht signifikant senken. Die Autoren postulieren jedoch einen protektiven Effekt der Fenretinid-Therapie für die Entstehung von Zweit-Tumoren bei

prämenopausalen Patientinnen und einen gegensätzlichen Effekt bei Patientinnen in der Post-Menopause (Veronesi et al. 1999). Diese Ergebnisse werden wegen der verwandten Methodik in der Literatur sehr kontrovers diskutiert und es sind weitere Studien nötig, um diese protektive Wirkung der Fenretinid-Therapie zu bestätigen (Piantadosi et al. 1999, Veronesi et al. 2000, Meyskens, Jr. et al. 2000, J Natl Cancer Inst et al. 2000).

I.4 Das IGF-System

I.4.1 Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF)

Die insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) oder Somatomedine, bestehen aus einer Familie von Wachstumshormon (GH) abhängigen Peptiden, die wie Proinsulin aus einer A- und B-Kette mit einem dazwischen liegenden C-Peptid bestehen (Rosenfeld et al. 1990). Bis heute wurden zwei verschiedene insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren identifiziert. IGF-I hat ein Molekulargewicht von 7649 und besteht aus 79 Aminosäuren, IGF-II hat ein Molekulargewicht von 7471 und besteht aus 67 Aminosäuren (Rinderknecht et al. 1978). IGF-I und IGF-II sind wichtige Mitogene für normale und maligne Zellen und können die Proliferation über einen autokrinen/parakrinen Signalweg regulieren (Jaques et al. 1988, Daughaday et al. 1990). Für die Vermittlung ihrer Wirkung binden die IGF mit hoher Affinität an spezifische Membran-Rezeptoren der Zellen (Rosenfeld et al. 1986). Der IGF-I-Rezeptor ist ein Heterodimer von 300-350 kDa vergleichbar mit dem Insulin-Rezeptor und trägt eine Tyrosin-Kinase auf der Innenseite der Membran (Ullrich et al. 1986, Yarden et al. 1988). An den IGF-I-Rezeptor binden IGF-I, IGF-II und mit geringer Affinität auch Insulin (Schardt et al. 1993). Über den IGF-I-Rezeptor werden das Wachstum und die Differenzierung der Zellen reguliert. Der IGF-II-Rezeptor besteht aus einer Einzelkette von 215 kDa mit einer großen extrazellulären Domäne und einer kleinen intrazellulären Domäne (Schardt et al. 1993). Dieser Rezeptor, mit hoher Affinität für IGF-II und geringer Affinität für IGF-I, ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der an dem Transport von lysosomalen Enzymen beteiligt ist. Seine Rolle für den Signalweg der IGFs ist nicht bekannt (Roth et al. 1988, Nishimoto et al. 1987, Minniti et al. 1992). Auch für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzell-Linien konnte bereits

gezeigt werden, dass diese IGF produzieren, die IGF-Rezeptoren exprimieren und die sog. Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungs-Proteine (IGFBP) in das Zellkultur-Medium sezernieren (Jaques et al. 1988, Reeve et al. 1992).

1.4.2 IGF Bindungs-Proteine (IGFBP)

Sowohl im Serum, als auch in Geweben und Zell-Kultur Medien sind die IGF's an spezifische Bindungsproteine gebunden (Baxter et al. 1986). Bereits 1987 gelang es, fünf verschiedene molekulare Formen von Bindungsproteinen im menschlichen Serum zu isolieren (Hardouin et al. 1987). Bis heute sind insgesamt sieben IGFBP identifiziert (Swisshelm et al. 1995). Darüber hinaus sind einige, den IGFBP assoziierte Proteine, die mit IGFBP-rP1-5 bezeichnet werden, charakterisiert (Baxter et al. 1998, Hwa et al. 1999). Die IGFBPs bestehen aus einer N-terminalen Liganden-Bindungs Domäne und einer C-terminalen Region, die für die Protein-Protein und/oder Protein-Extrazellulärmatrix Interaktion wichtig sind (Kelley et al. 1996). Die Bindungsproteine dienen nicht nur dem Transport der IGF, sondern modulieren auch die Interaktion mit deren Rezeptoren (Cohen et al. 1976). Darüber hinaus haben einige der IGFBP direkte, Rezeptor-vermittelte Funktionen, die unabhängig von den IGF sind (Kelley et al. 1996). In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien konnte die mRNA der IGFBP-1 bis -6 und die Expression und Sekretion der IGFBP-1 bis -4 und IGFBP-6 gezeigt werden (Jaques et al. 1992).

I.5 Ziel der Arbeit

Retinoide haben Bedeutung für die Proliferation und Differenzierung epithelialer Gewebe, für die Immunmodulation und die Embryonalentwicklung vor allem der Lunge. Daher wird versucht, Retinoide auch für die Chemoprävention und Therapie maligner Tumor zu nutzen. Das wichtigste natürlich vorkommende Retinoid, die *All-trans*-Retinsäure, hemmt das Wachstum von Zell-Linien verschiedener Tumore. Im Gegensatz dazu sind viele Bronchialkarzinomzell-Linien resistent gegenüber der Wachstumshemmung durch *All-trans*-Retinsäure. Darüber hinaus wird der Einsatz beim Patienten durch die hohe Toxizität der *All-trans*-Retinsäure limitiert.

Auf der Suche nach neuen Retinoiden, die das Wachstum von Bronchialkarzinomzell-Linien hemmen und geringe Nebenwirkungen haben, erweist sich Fenretinid [N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, 4-HPR] als eine interessante Substanz. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fenretinid das Wachstum von Zell-Linien vieler maligner Tumore hemmt. Darunter sind auch Zell-Linien, die gegen *All-trans*-Retinsäure resistent sind. Verglichen mit *All-trans*-Retinsäure hat Fenretinid nur geringe Nebenwirkungen und wurde in ersten klinischen Langzeitstudien von den Patienten gut vertragen.

Die Kenntnis der zellulären Mechanismen, die an der Wachstumshemmung durch Retinoide beteiligt sind, ist grundlegend für das Verständnis und den Vergleich der Wachstumshemmung verschiedener Retinoide. Die Wachstumshemmung durch *All-trans*-Retinsäure beruht auf der Induktion von Differenzierung. IGF-Bindungsprotein 3 (IGFBP-3) gilt dabei als Vermittler der Wachstumshemmung durch *All-trans*-Retinsäure (Gucev et al. 1996). Im Gegensatz dazu wird für die Wachstumshemmung durch Fenretinid die Induktion von Apoptose verantwortlich gemacht. Die Bedeutung von IGFBP-3 für die Wachstumshemmung durch Fenretinid ist bisher noch nicht untersucht worden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomzell-Linien zu untersuchen, vor allem im Hinblick auf den klinischen Einsatz von Fenretinid bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom. Dazu soll zuerst die Wirkung von Fenretinid in Wachstumsversuchen an 12 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien getestet werden. An ausgesuchten Zell-Linien soll dann die Wirkung von Fenretinid mit der von *All-trans*-Retinsäure verglichen werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, die Bedeutung der Apoptose und die Rolle von IGFBP-3 für die Wachstumshemmung durch Fenretinid zu untersuchen. Die Induktion von Apoptose soll mit dem TUNEL-Assay nach Inkubation der Zell-Linien mit Fenretinid geprüft werden. Durch Messung der IGFBP-3 Konzentration in konditionierten Medien, Quantifizierung der IGFBP-3 mRNA-Expression und Anfärbung von IGFBP-3 Protein im Zellkern nach Inkubation mit Fenretinid soll ein Zusammenhang von IGFBP-3 und der Wachstumshemmung durch Fenretinid untersucht werden. Aus einem Zusammenhang zwischen der Wachstumshemmung durch Fenretinid und IGFBP-3 könnten neue Erkenntnisse über den bisher nicht nachgewiesenen Signalweg von Fenretinid gewonnen werden.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Geräte

- Zentrifugen

| | |
|---------------------------|----------------------|
| Hermle ZK364 | Hermle, Gosheim |
| Biofuge A+B | Heraeus, Hanau |
| Zytozentrifuge Cytospin 2 | Shandon, England |
| Speed vac Concentrator | Bachofer, Reutlingen |

- Zellzahlbestimmung

| | |
|-----------------|--------------------------------------|
| Coulter Counter | Coulter Counter Electronics, Krefeld |
| Neubauer-Kammer | Planoptik |

- Mikroskope, Objektive

| | |
|---|-------------------------|
| Mikroskop Leitz Fluovert | Leitz, Wetzlar |
| Leica DMLS | Leica, Wetzlar |
| Leitz Orthoplan Phasenkontrastmikroskop | Leitz, Wetzlar |
| NPL Fluotar 10, Phaco 1 | Leitz, Wetzlar |
| Mikroskop-Kameraaufsatz MPS 12 | Wild, Heerburg, Schweiz |
| Mikrophot MPS 05 | Wild, Heerburg, Schweiz |
| Kamera Vario-Orthomat | Leitz, Wetzlar |
| Rasterokular L-Plan | Leica, Wetzlar |

- Sonstige Geräte

| | |
|------------------------|-------------------------|
| Multiskan RC | Labsystems, Frankfurt |
| Peltier Thermal Cycler | Biozym, Hess. Oldendorf |

II.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--------------------------------------|
| Coulter Counter Messgefäße | Coulter Counter Electronics, Krefeld |
| Film Ektachrome 64 professional | Kodak |
| Filter Millex-GV 0,22 µm | Millipore Corporation, USA |
| Gewebekulturflaschen 75 cm ³ , 50 cm ³ | Greiner, Frickenhausen |
| 24-well-Platten | Greiner, Frickenhausen |
| Lab Tek TM Chamber Slide TM System (8 Kammern) | Nunc, Wiesbaden |

II.1.3 Chemikalien, Lösungen, Medien

| | |
|--|--------------------------------------|
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| Albumine, bovine (BSA) | Sigma, München |
| All- <i>trans</i> -Retinsäure (ATRA) | Sigma, München |
| Aqua ad iniectabilia | Braun, Melsungen |
| Chloroform | JT Baker, Holland |
| Corbit | Hecht, Stadtrade |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt |
| DTT Puffer (0,1 M) | Gibco, Eggenstein |
| 5x Dye Solution | Fermentas, Lithuania |
| EDTA 0,02% in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | Boehringer, Mannheim |
| Ethanol absolut | Apotheke Klinikum Marburg |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Fenretinid (N-[4-hydroxyphenyl]retinamide) | Sigma, München |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Gibco, Eggenstein |
| First-Strand Buffer | Boehringer, Mannheim |
| Haemalaun 10%ig | Merck, Darmstadt |
| H ₂ O ₂ | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn |
| Isoton III Coulter Counter Solution | Coulter Counter Electronics, Krefeld |
| Isopropanol (2-Propanol) | JT Baker, Holland |
| Kaisers Glyceringelatine | Merck, Darmstadt |
| Methanol | JT Baker, Holland |
| Na-Selenit | Sigma, München |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| 10x PCR-Puffer | Boehringer, Mannheim |
| Pikrinsäure-Lösung, gesättigt | Merck, Darmstadt |

| | |
|--|---------------------------|
| RPMI 1640 mit L-Glutamin (R-0) | Gibco, Eggenstein |
| Schweineserum 20% | DAKO, Dänemark |
| Transferrin, human (98% eisenfrei) | Sigma, München |
| Trypanblau 0,01% (w/v) | Apotheke Klinikum Marburg |
| Trypsin-Lösung 2,5% ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} | Boehringer, Mannheim |
| Xylol | Merck, Darmstadt |

Wegen der Lichtempfindlichkeit von Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure wurden beide Substanzen lichtgeschützt gelagert und alle Versuche in abgedunkelten Räumen durchgeführt.

II.1.4 Kits

| | |
|---|--|
| ABC-Kit | Vector, USA |
| ACTIVE TM IGFBP-3 | Diagnostic System Laboratories, Sinsheim |
| ApoDETEC ^{®TM} | Enzo Diagnostics, USA |
| DAB-Kit | Vector, USA |
| LSAB [®] + Kit, Peroxidase/DAB + | DAKO, Dänemark |
| Simply Sensitive ^{®TM} Detection Kit | Enzo Diagnostics, USA |

II.1.5 Antikörper

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| IGFBP-3 (Produkt-Nr. IGF63) | Mediagnost, Tübingen |
| Rabbit-IgG | DAKO, Dänemark |

II.1.6 Enzyme

| | |
|--|----------------------|
| Superscript-RT (200 U/ μl) | Gibco, Eggenstein |
| RNase Inhibitor | Boehringer, Mannheim |
| Taq-Polymerase | Boehringer, Mannheim |

II.1.7 Nukleinsäuren, Nukleotide und Primer für die RT-PCR

| | |
|---------------------|----------------------|
| 100bp-DNA-Ladder | Gibco, Eggenstein |
| Low Mass DNA-Ladder | Gibco, Eggenstein |
| dNTP-Set (100 mM) | Boehringer, Mannheim |
| dNTP-Mix (10 mM) | Gibco, Eggenstein |
| oligo dT | Gibco, Eggenstein |

Die für die RT-PCR notwendigen Primer wurden von der mikrochemischen Einheit des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT), Marburg, hergestellt.

GAPDH 5'-Primer: 5' CGTCTTCACCACCATGGAGA 3'

GAPDH 3'-Primer: 5' CGGCCATCACGCCACAGTTT 3'

IGFBP-3 5'-Primer: 5' GCTCTGCGTCAACGCTAGTG 3'

IGFBP-3 3'-Primer: 5' GCTTCCTGCCTTTGGAAGGG 3'

II.1.8 Hergestellte Lösungen und Medien*Zellkultur*All-trans-Retinsäure Lösung

1,0 mg der bei -20°C gelagerten Trockensubstanz (MG 300,45) wurden in 1000 µl Ethanol abs. entsprechend einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und dann mit 2000 µl Ethanol abs. auf eine 10^{-3} M Lösung verdünnt. Mit dieser bei 4°C gelagerten Stammlösung wurden vor jedem Versuch die Verdünnungsreihen in R-10 frisch hergestellt.

Einfriermedium

Die Zellen, die nicht sofort nach ihrer Konditionierung für die RNA-Extraktion verwendet werden konnten, wurden in Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C gelagert. Das Medium bestand aus folgenden Komponenten:

RPMI

50% FKS

7,813 g/ml DMSO (RT)

1%ige Ethanol-Lösung in R-10

Als Kontrolle wurde in allen Versuchen eine Inkubation der Zellen mit einer 1 %igen Ethanol-Lösung in R-10 mitgeführt. Diese Ethanol-Konzentration entspricht der Ethanol-Konzentration in den Versuchansätzen mit 10 μ M Fenretinid oder 10 μ M All-*trans*-Retinsäure.

Fenretinid-Lösung

Mit Fenretinid wurde eine 10^{-2} M ethanolische Lösung angesetzt und jeweils als 50 μ l Aliquots bei -20°C gelagert. Bei weiterem Gebrauch wurde die Lösung mit Ethanol abs. auf 10^{-3} M verdünnt und eine Verdünnungsreihe mit R-10 hergestellt.

R-0/Trypsin-Lösung

Zum Ablösen der Zellen aus 24-well Platten wurde eine 7%ige Trypsin-Lösung in RPMI 1640 (R-0) angesetzt.

R-10 Medium

Das R-10 Medium bestand aus Fetalem Kälberserum (FKS), welches vor Gebrauch bei 56°C dekomplementiert und sterilfiltriert wurde. Anschließend wurde eine 10% ige FKS-Lösung in RPMI 1640 angesetzt.

ST-Medium

Das in einigen Versuchen verwendete Serum-freie Medium bestand aus folgenden Zusätzen:

500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin

5,2 ng/ml Na-Selenit

5 μ g/ml Transferrin, human (98% eisenfrei)

Immunzytochemische Färbung

PBS-Puffer

1,4 M NaCl

80 mM Na₂HPO₄

15 mM KH₂PO₄

Die Lösung wurde mit HCl bzw. NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt.

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat

2 mM EDTA

Die Lösung wurde mit konz. Essigsäure auf einen pH von 8,0 eingestellt.

Zamboni-Reagenz

0,13 g/ml Paraformaldehyd

150 ml gesättigte Pikrinsäure-Lösung

4 h bei 60°C im Wärmeschrank inkubieren und stündlich schütteln, mit 2,5%iger NaOH neutralisieren, filtrieren und mit PBS bei einem pH-Wert von 7,3 auf 1l auffüllen.

II.2 Methoden

II.2.1 Bronchialkarzinomzell-Linien

Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzell-Linien (NSCLC):

| Adenokarzinom | Plattenepithelkarzinom | Großzelliges Karzinom |
|-------------------|------------------------|-----------------------|
| A549 ¹ | EPLC-32M1 | LCLC-97TM1 |
| NCI-H125 | EPLC-272H | NCI-H157 |
| NCI-H23 | U1752 | NCI-H661 |
| NCI-H596 | | U1810 |
| NCI-H322 | | |

¹ Bronchoalveolarzell-Karzinom

Die permanenten humanen Bronchialkarzinomzell-Linien wurden vom National Cancer Institute (NCI) Bethesda, MD, (Gazdar et al. 1986) sowie von Dr. J Bergh, (Bergh et al. 1981) Dept. of Pathology and Oncology, University of Uppsala, Schweden (U) bezogen oder in unserem Labor etabliert und charakterisiert (Bepler et al. 1987).

II.2.2 Zellkultur

Die adhärent wachsenden Zell-Linien wurden bei 37°C mit 7% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in R-10 (RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum) kultiviert. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zell-Linien ein- bis zweimal wöchentlich über höchstens 20 Passagen je Zell-Linie geteilt. Dazu wurde das Medium aus den Gewebekulturflaschen (75 cm³, Greiner) abgesaugt, 5 ml 0,02%ige EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen zugegeben und diese für einige Minuten bei 37°C inkubiert, bis sie sich ablösten. Die entstandene Zell-Suspension wurde durch Pipettieren vereinzelt und in einem Verhältnis von 1:10 auf die neuen Gewebekulturflaschen verteilt.

II.2.3 Wachstumsversuche

Mit dieser Versuchsanordnung sollte der Einfluss von Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure auf das Wachstum von insgesamt 12 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien getestet werden. Dazu wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase mit EDTA 0,02% abgelöst, mit R-0 gewaschen und in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in 24-well Platten in R-10 ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 0,01/0,1/1,0/5,0 und 10,0 μM Fenretinid in R-10 oder All-*trans*-Retinsäure für 6 Tage inkubiert. Die Versuche wurden dabei als 4-fach Bestimmung je Konzentration durchgeführt. Am 6. Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml R-0/Trypsin-Lösung über 60 min. bei 37°C abgelöst. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette resuspendiert und 100 μl der Zellsuspension in einem Coulter Counter Messgefäß mit der Elektrolytlösung Isoton III auf 10 ml verdünnt. Die Zellzahl wurde mit dem Coulter Counter gemessen. Dabei wird die Zellsuspension durch eine Öffnung zwischen zwei Elektroden gesogen. Beim Durchtritt von nicht leitenden Teilchen, wie z.B. Zellen, kommt es zu einer Änderung des elektrischen Widerstandes zwischen den Elektroden. Die Anzahl und die Höhe dieser Widerstandsänderungen, die proportional zur Größe der Teilchen ist, werden vom Coulter Counter registriert.

In den weiteren Versuchen wurde die Zell-Linie A549 verwendet, um die Wachstumshemmung durch Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure weiter zu charakterisieren. Zur Ermittlung von Wachstumskinetiken der Zell-Linie A549 unter Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure wurde die Zellzahl täglich mittels Coulter-Counter gemessen. Als Maß der Wachstumsgeschwindigkeit wurde die Zell-Verdopplungszeit (population doubling time, pdt) errechnet.

Für die Untersuchung der Reversibilität der Wachstumshemmung wurde die Zell-Linie A549 in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in Gewebekulturflaschen (50 cm^3) in R-10 ausgesät und am nächsten Tag für 6 Tage mit 5 bzw. 10 μM Fenretinid oder 5 bzw. 10 μM All-*trans*-Retinsäure inkubiert. Am Tag 6 wurden die Zellen mit EDTA 0,02 % abgelöst, in R-0 gewaschen und für jeweils zwei getrennte Versuchsansätze in 24-well Platten in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml ausgesät. In einem der beiden Ansätze wurden die Zellen weiterhin mit dem entsprechenden Retinoid in gleicher Konzentration für 6 Tage inkubiert. In dem zweiten Ansatz wuchsen die Zellen jetzt in

R-10 ohne weiteren Zusatz von Retinoiden ebenfalls über 6 Tage. In beiden Versuchsansätzen wurde die Zellzahl täglich mittels Coulter Counter bestimmt.

II.2.4 TUNEL-Assay

Zum Nachweis einer möglichen Apoptoseinduktion nach Stimulation der Zellen mit Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure wurde der TUNEL-Assay durchgeführt. Dazu wurde die Zell-Linie A549 in unterschiedlicher Dichte in Gewebekulturflaschen (50 cm³) ausgesät und entweder mit 5, 10 µM Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure inkubiert. Nach 2, 5 und 6 Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen mit EDTA 0,02% abgelöst und Zytozentrifugen-Präparate hergestellt. An diesen Präparaten wurde der TUNEL-Assay mit dem ApoDETEC[®]™ Cell Death Assay System nach den Angaben von ENZO Diagnostics durchgeführt. Der Assay beinhaltet als ersten Teil das „Labeling Pack“, bestehend aus einem biotinylierten 16-dUPT Primärantikörper zur Kopplung an das 3'-OH-Ende der DNS-Bruchstücke. Der zweite Teil, das „Horseradish Peroxidase-DAB In Situ Detection System“ dient der Kopplung eines Streptavidin-biotinylierten Merretich-Peroxidase Komplexes an den Primärantikörper, um die DNS-Bruchstücke anschließend mit Diaminobenzidin (DAB) zu färben. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden dargestellt. Nach einem Waschschrift über 2x5 min. in Aqua destilata erfolgte die Fixation der Präparate über 10 min in -20°C kaltem Aceton. Nach Waschen der Präparate in PBS für 3 min wurde zuerst 1 Tropfen Equilibration-Buffer aufgetragen und die Präparate über 5 min bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden je 30 µl der vorbereiteten Reaktionsmischung aus 27 µl Labeling Reagent (Bio-16-dUTP) und 3 µl terminaler Transferase aufgebracht und die Präparate über 60 min bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift von 3x1 min in PBS wurden je 2 Tropfen Detection Reagenz aufgetragen und die Präparate wieder über 60 min bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Nach dem Spülen der Präparate mit einer Pipette und PBS wurden die Objektträger über 2x1 min in PBS gewaschen. Die Farbreaktion startete nach Auftragen von je 30 µl des vorbereiteten Colour-Mix aus 1 ml Colour-Reagenz (H₂O₂ in Acetat-Puffer) und 1 Tropfen DAB. Nach Inkubation über 20 min bei 37°C in einer Feuchtkammer wurden die Präparate zum Stoppen der Farbreaktion für 1 min in PBS gewaschen und anschließend für 10 min unter Leitungswasser gespült. Die Entwässerung der Präparate

erfolgte mittels Eintauchen über je 2 min in eine Alkohol-Lösung mit steigender Ethanol-Konzentration (70%,80%,90%,95%, Ethanol absolut). Abschließend wurden die Präparate für 4 min in Xylol getaucht und mittels Aquatex eingedeckelt. Die Färbung der Präparate wurde sowohl im Lichtmikroskop als auch im Phasenkontrast-Mikroskop ausgewertet.

II.2.5 Messung IGFBP-3 Konzentration mittels ELISA

II.2.5.1 Konditionierung der Zellkulturmedien

Die Messung der IGFBP-3 Konzentration in den konditionierten Medien erfolgte parallel in den Wachstumsversuchen zum Vergleich von Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure (vgl. II.2.3). Dafür wurde die Zell-Linie A549 in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in 24-well Platten in R-10 ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 0,01/0,1/1,0/5,0 und 10,0 μ M Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure für 6 Tage inkubiert. Die Zell-Kultur-Überstände wurden mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig abgenommen, bei 400 x g zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

II.2.5.2 Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

Zur Messung der IGFBP-3 Konzentration in den konditionierten Medien wurde der ACTIVETM IGFBP-3 Kit (Diagnostic System Laboratories, Sinsheim) verwendet. Zusammen mit den mitgelieferten Standards und Kontrollen wurden die konditionierten Medien nach Anleitung in den Test eingesetzt. Dazu wurden die Proben für den Einsatz in den Assay auf 1:100 mit dem Nullstandard verdünnt. Je 25 μ l der Standards, Kontrollen und Proben wurden in die mitgelieferte Mikrotiterplatte pipettiert und der Assay, wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt. Nach Zugabe von 50 μ l des mitgelieferten Assay-Puffers erfolgte die Inkubation der Mikrotiterplatte für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (500-600 rpm). Das in den Proben enthaltene IGFBP-3 wurde dabei an Antikörper gebunden, mit denen die Wells der Platte beschichtet waren. Anschließend wurde der Puffer aus den Wells abgesaugt und diese insgesamt 5-mal mit dem Waschpuffer (gepufferte NaCL-Lösung) gewaschen. Anschließend Zugabe von je 100 μ l des mitgelieferten Antikörper-Enzym-Konjugates.

Die darin enthaltenen IGFBP-3 Antikörper, die mit Merretich-Peroxidase gekoppelt waren, konnten in der anschließenden Inkubation über 1h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (500-600 rpm) an das IGFBP-3 binden. Nach einem erneuten 5-maligen Waschschrift mit Waschlösung erfolgte die Farbreaktion nach Zugabe von je 100 µl TMB-Chromogen-Lösung (Tetramethylbenzidin in Citratpuffer) und Inkubation auf einem Horizontalschüttler (500-600 rpm) bei Raumtemperatur. Nach 10 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 100 µl Stopp-Lösung (Schwefelsäure) gestoppt. Die Absorption der entstandenen Farbreaktion wurde bei 450 nm innerhalb von 30 min gemessen.

II.2.6 Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Färbung von IGFBP-3 im Kern der Zellen wurde die Zell-Linie A549 für 48 h mit 10 µM Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure und EtOH 1% als Kontrolle inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml EDTA 0,02% abgelöst und mit R-0 gewaschen. Danach wurden die Zellen auf 10⁶ Zellen/ml mit R-0 verdünnt und damit Zytozentrifugen-Präparate hergestellt. Die fertigen Präparate wurden 1 Tag bei Raumtemperatur getrocknet und wie im Folgenden beschrieben gefärbt. Vorhandene endogene Peroxidasen der Zellen wurden in einer Lösung aus 100 ml -20°C kaltem Methanol und 1 ml 8°C kaltem H₂O₂ (30%ig), in die die Präparate für 20 min getaucht wurden, inaktiviert. Nach Waschen der Präparate in Aqua destilata (2x5 min) wurden diese für 10 min in Zamboni-Lösung getaucht, welche die Kernmembran der Zellen öffnete. Nach erneutem Waschen der Präparate in PBS (2x1 und 1x10 min) wurden je 50 µl 30%iges Schweineserum aufgetragen und die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Damit wurden vorhandene endogene Ig-Antikörper inaktiviert. Nach Verdünnung der IGFBP-3 Antikörper auf 1/100 sowie der Kaninchen-IgG Antikörper auf 1/1500 in 1 %igem Schweineserum als Negativ-Kontrolle wurden die Präparate mit je 50 µl des Primärantikörpers in einer Feuchtkammer bei 8°C inkubiert. Der Zweitantikörper in Form von 50 µl des biotinylierten Kaninchen-Antikörpers aus Schweine IgG wurde nach erneutem Spülen in PBS (2x1 und 1x10 min) aufgetragen und die Präparate für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde je 1 Tropfen Streptavidin-Peroxidase-Konjugat aufgetragen und die Präparate für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Merretich-

Peroxidase an den Zweitantikörper gekoppelt wurde. Danach wurden die Präparate vorsichtig mit Aqua destilata gespült. Die Färbung erfolgte durch Inkubation der Präparate mit einem Tropfen Substrat-Chromogenlösung (Diaminobenzidin). Nach Spülung der Präparate in Aqua destilata wurden die Präparate für 1 min in 10%igem Haemalaun gegengefärbt. Abschließend wurden die Objektträger für 10 min in Leitungswasser gespült und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

II.2.7 IGFBP-3 mRNA-Analysen

II.2.7.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Zur Messung der mRNA-Expression von IGFBP-3 wurde Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen gewonnen. Zuvor waren die Zellen für 24 h mit entweder 10 μ M Fenretinid oder 10 μ M All-*trans*-Retinsäure und EtOH 1% als Kontrolle in R-10 stimuliert worden. Die mit EDTA 0,02% abgelösten Zellen wurden mit R-0 auf 2×10^6 Zellen/ml verdünnt und entweder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet. Die 2×10^6 Zellen wurden für 10 min bei $100 \times g$ und 5°C zentrifugiert und danach in 800-1000 μ l RNeasy aufgenommen. Nach Zugabe von 100 μ l Chloroform und vortexen für 20-30 sek verblieben die Proben für 5 min auf Eis bei 4°C . Zentrifugation für 15 min ($15000 \times g$, 4°C) trennte verschiedene Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, zur Fällung der ionischen Detergentien 400-500 μ l Isopropanol zugegeben und die Proben <60 min auf Eis bei 4°C gelagert. Danach erneute Zentrifugation ($15000 \times g$, 4°C) für 15 min. Anschließend wurde das Pellet mit eiskaltem Ethanol (absolut) gewaschen und wieder 8 min bei $7500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die restliche Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Je nach Größe wurde dann das Pellet mit 50-100 μ l Aqua destilata gelöst und die Proben 10 min bei 57°C im Wärmeblock inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation (8 min, $7500 \times g$, 4°C) wurde der Überstand (RNA) abgenommen und die Qualität und Konzentration der RNA mittels Photometermessung bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Protein) ermittelt. Das Verhältnis aus der Extinktion (260 nm): Extinktion (280 nm) gibt dabei die Güte der erhaltenen RNA an. Dabei war ein Verhältnis von $<2,0$ anzustreben. 1,000 Einheiten der Extinktion bei 260 nm entsprachen einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Entweder wurde die RNA bis zum weiteren Gebrauch bei

-80°C gelagert oder direkt mit der cDNA Synthese fortgefahren. Zuvor war die Reinheit der extrahierten RNA in einem 1,5%igen Agarose-Gel überprüft worden.

II.2.7.2 Herstellung der cDNA

Für die Herstellung der cDNA wurden 4 µg der Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurde mit DEPC-H₂O auf 10,0 µl verdünnt und 1,0 µl Oligo dT (0,5 µg/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 70°C für 10 min inkubiert und auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurden je 9 µl eines jeweils frisch hergestellten Mix zugegeben:

- 4 µl First Strand Buffer
- 2 µl DTT 0,1 M
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Rnase-Inhibitor
- 1 µl Superscript-RT

Die Proben wurden 2 h bei 41°C inkubiert und 10 min bei 95°C denaturiert, mit je 40 µl H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

II.2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion PCR

Als Referenzgen für die IGFBP-3 PCR diente die Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Nach Durchführung der GAPDH-PCR ermöglichte die Bestimmung der Bandenintensitäten mittels der Software Gelscan Pro 2.0 die Angleichung der eingesetzten cDNA Menge. Der Einsatz gleicher Mengen cDNA war Voraussetzung für die quantitative Auswertung der im Anschluss durchgeführten IGFBP-3 PCR.

Für die PCR wurde ein Ansatz von 100 µl je Probe hergestellt, bestehend aus 99 µl Mix und 1 µl der Gesamt cDNA.

| Mix: | <u>GAPDH</u> | <u>IGFBP3</u> |
|------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 10 µl 10x PCR-Puffer | 10 µl 10x PCR-Puffer |
| | 2 µl dNTP-Mix (10 mM) | 2 µl dNTP-Mix (10 mM) |
| | 80,5 µl H ₂ O | 81,5 µl H ₂ O |
| | 3 µl 5'-Primer (50 pmol) | 2,5 µl 5'-Primer (50 pmol) |
| | 3 µl 3'-Primer (50 pmol) | 2,5 µl 3'-Primer (50 pmol) |
| | 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) | 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) |

Folgende Bedingungen wurden für die PCR gewählt:

| | <u>GAPDH</u> | <u>IGFBP-3</u> |
|-----------------|---------------|----------------|
| Denaturierung | 95°C 0:45 min | 95°C 0:45 min |
| Annealing Temp. | 60°C 1:00 min | 58°C 1:00 min |
| Elongation | 72°C 1:00 min | 72°C 1:00 min |
| Zyklen-Zahl | 22 | 35 |

II.2.8 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden insgesamt drei Mal durchgeführt. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche zeigen den Mittelwert der 4-fachen Bestimmung eines repräsentativen Versuches. Mit dem zweiseitigen Students-T-Test wurde die Signifikanz der Ergebnisse getestet, wobei das Signifikanzniveau mit $p < 0,01$ gewählt wurde.

Die Berechnung der IC₅₀-Werte aus den Wachstumsversuchen erfolgte je nach Verlauf der Dosis-Effekt-Kurven entweder über eine lineare oder eine exponentielle Regression. Über die erhaltene Funktionsgleichung wurde der IC₅₀-Wert dann berechnet.

Die Zell-Verdopplungszeit (population doubling time, pdt) in den Versuchen zur Wachstumskinetik wurde in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen nach folgender Formel errechnet:

$$\text{pdt} = 48 \text{ h} \times \log 2 / \{ \log (\text{Zellzahl Tag } x) - \log (\text{Zellzahl Tag } y) \}.$$

Zur Berechnung der Bandenintensitäten für die quantitative Aussage der RT-PCR diente die Software Gelscan Pro 3.0 (BioSciTec GmbH, Frankfurt).

III. Ergebnisse

III.1 Wachstum der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien unter Fenretinid

Um den Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum von Lungentumorzellen zu testen, wurden Wachstumsversuche mit 12 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien durchgeführt, die sich in die drei histologisch bekannten Varianten (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, großzelliges Karzinom) aufteilen lassen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in 24-Well Platten ausgesät und mit steigenden Konzentrationen Fenretinid (0,01-10 μM) inkubiert. Die Zellzahl wurde am 6. Tag mittels Coulter Counter gemessen. Exemplarisch sind in Abbildung 1 die Ergebnisse eines der Wachstumsversuche der Zell-Linie A549 gezeigt. Mit steigender Konzentration von Fenretinid lässt sich eine Reduktion der gemessenen Zellzahl auf ~50% gegenüber der Kontrolle (EtOH 1%) feststellen.

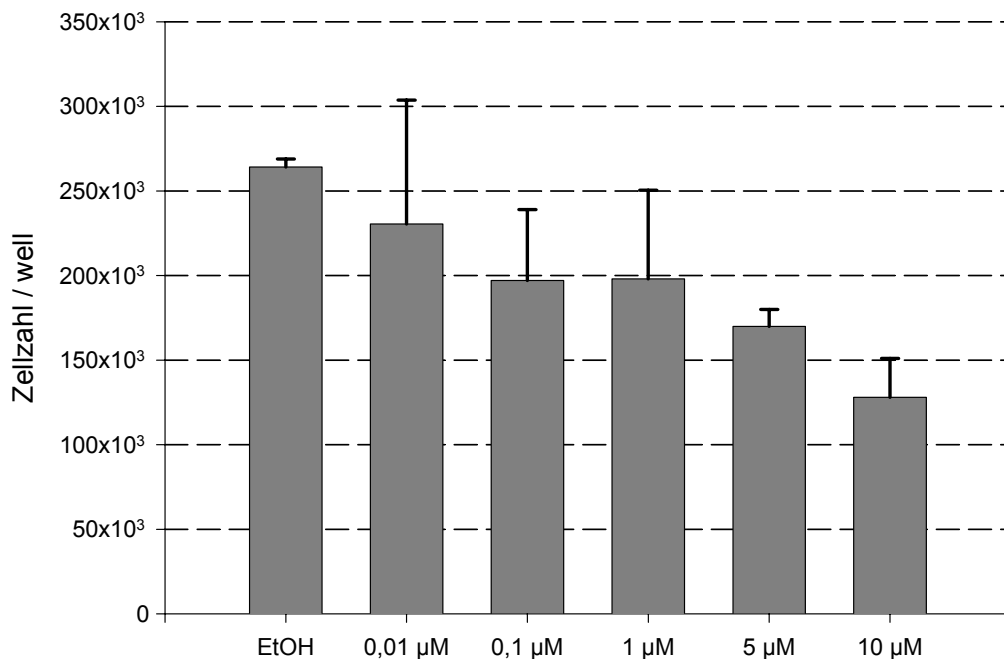


Abb. 1: Wachstum von A549 unter Fenretinid. Die Zellen wurden für 6 Tage mit steigenden Konzentrationen Fenretinid inkubiert. Die Zellzahl wurde mittels Coulter Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

Bei 11 der insgesamt 12 getesteten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien zeigt sich unter 10 μM Fenretinid eine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Eine Übersicht über das Wachstum der Zell-Linien unter 10 μM Fenretinid verglichen zur Kontrolle gibt Tabelle 3. Die aus den Wachstumsversuchen errechneten IC₅₀ Werte liegen zwischen 3,3 μM (LCLC-97TM1) und >10 μM Fenretinid bei den Zell-Linien, bei denen Fenretinid das Wachstum nicht um 50% im Vergleich zur Kontrolle hemmen konnte.

| Zell-Linie | Histologie | Wachstum im Vergleich zur Kontrolle | | IC-50 [μM] |
|------------|------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------|
| | | Mittelwert | Standard-Abweichung | |
| LCLC-97TM1 | LCLC | 12 % | 2,2 % | 3,3 |
| EPLC-272H | SCC | 18 % | 4,9 % | 6,0 |
| U1810 | LCLC | 33 % | 5,9 % | 5,0 |
| NCI-H661 | LCLC | 33 % | 1,5 % | 7,4 |
| EPLC-32M1 | SCC | 39 % | 4,5 % | 8,2 |
| A549 | BA | 47 % | 4,4 % | 8,0 |
| NCI-H23 | AD | 48 % | 7,8 % | > 10,0 |
| NCI-H157 | LCLC | 52 % | 4,6 % | > 10,0 |
| U1752 | SCC | 61 % | 12,9 % | > 10,0 |
| NCI-H322 | AD | 73 % | 12,5 % | n.s. |
| NCI-H125 | AD | 76 % | 5,1 % | n.s. |
| NCI-H596 | AD | 100 % | 11,9 % | n.s. |

Tab. 3: Wachstum der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien unter 10 μM Fenretinid im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%). Das Wachstum der Kontrolle wurde dabei auf 100% gesetzt. Die IC₅₀-Werte wurden über eine Regression mit der erhaltenen Funktionsgleichung errechnet.

III.2 Vergleich der Wirkung von Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure

Um die Wirkung von Fenretinid mit anderen Retinoiden zu vergleichen, wurden 3 Zell-Linien mit Fenretinid bzw. All-*trans*-Retinsäure in Parallel-Versuchen für 6 Tage inkubiert. Die ausgewählten Zell-Linien (A549, EPLC-32M1 und LCLC-97TM1) repräsentieren jeweils einen Vertreter der 3 histologischen Varianten der Bronchial-Karzinome. Hierbei zeigt sich unter All-*trans*-Retinsäure bei A549 eine Hemmung des Wachstums auf 49%. In den beiden anderen Zell-Linien EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 erreichen die Zellen ein Wachstum von 87% bzw. 88%. Unter Fenretinid zeigt sich eine Reduktion der Zellzahl bei A549 auf 48%, bei EPLC-32M1 auf 43% und bei LCLC-97TM1 auf 23% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 2).

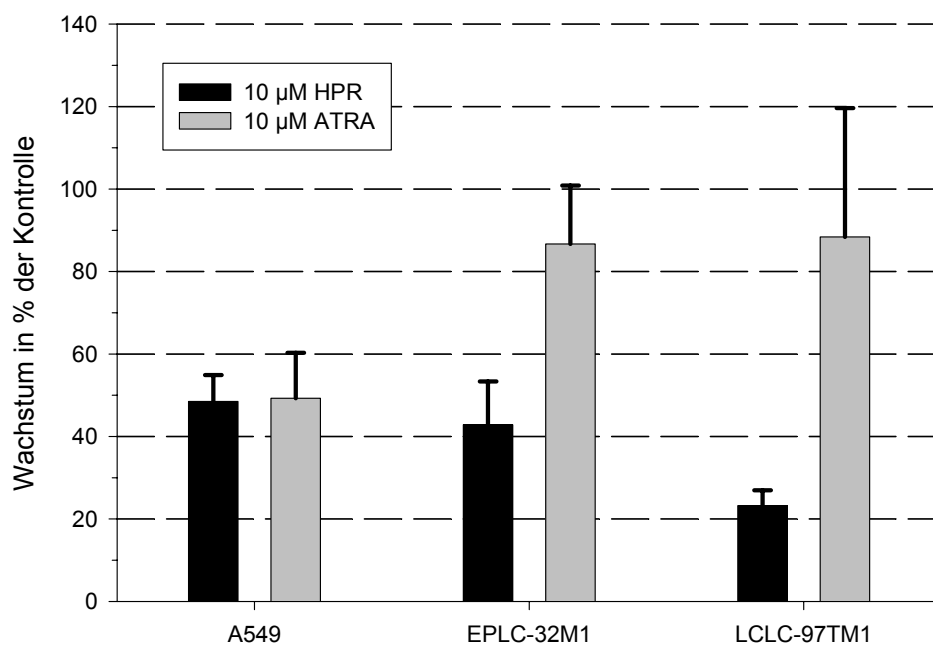


Abb. 2: Vergleich des Wachstums von A549, EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 unter 10 µM Fenretinid oder 10 µM All-*trans*-Retinsäure. Nach Inkubation der Zellen mit entweder 10 µM Fenretinid oder 10 µM All-*trans*-Retinsäure für 6 Tage wurde die Zellzahl mittels Coulter Counter gemessen. Das Wachstum ist als Mittelwert mit Standardabweichung in Prozent zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt. Das Wachstum der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt.

III.3 Wachstumskinetiken unter Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure

Zur Erstellung von Wachstumskinetiken der Zell-Linie A549 unter Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Substanz inkubiert und die Zellzahl täglich mittels Coulter Counter bestimmt (Abbildungen 3 a und b).

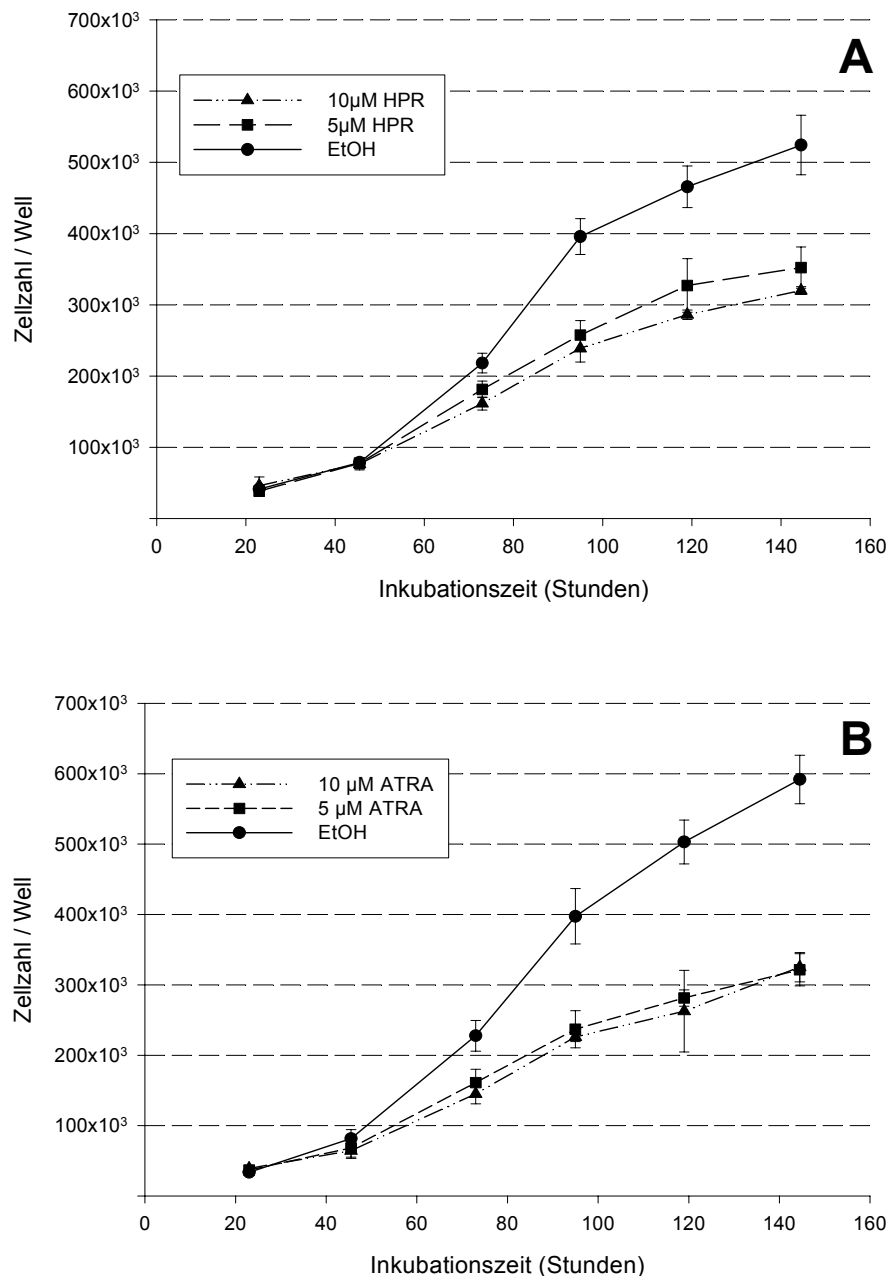


Abb. 3a,b: Wachstumskinetiken von A549 unter Fenretinid bzw. *All-trans*-Retinsäure. Die Zellen wurden mit jeweils 5 und 10 µM Fenretinid oder *All-trans*-Retinsäure inkubiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte täglich mittels Coulter Counter. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

Als Maß der Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen gilt die Zell-Verdopplungszeit, im Englischen auch population doubling time (pdt) genannt. Die Berechnung der Zell-Verdopplungszeit erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen nach folgender Formel:

$$\text{pdt} = 48 \text{ h} \times \log 2 / \{ \log (\text{Zellzahl Tag x}) - \log (\text{Zellzahl Tag y}) \}.$$

Die Zell-Verdopplungszeit der Zell-Linie A549 verlängert sich bei Inkubation mit Fenretinid im Vergleich zur Kontrolle von 21 h auf 28 h unter 5 μM und auf 29 h unter 10 μM Fenretinid. Auch bei Inkubation mit All-*trans*-Retinsäure ist die Zell-Verdopplungszeit mit jeweils 27 h unter 5 bzw. 10 μM All-*trans*-Retinsäure gegenüber der Kontrolle mit 21 h verlängert (Abbildung 4).

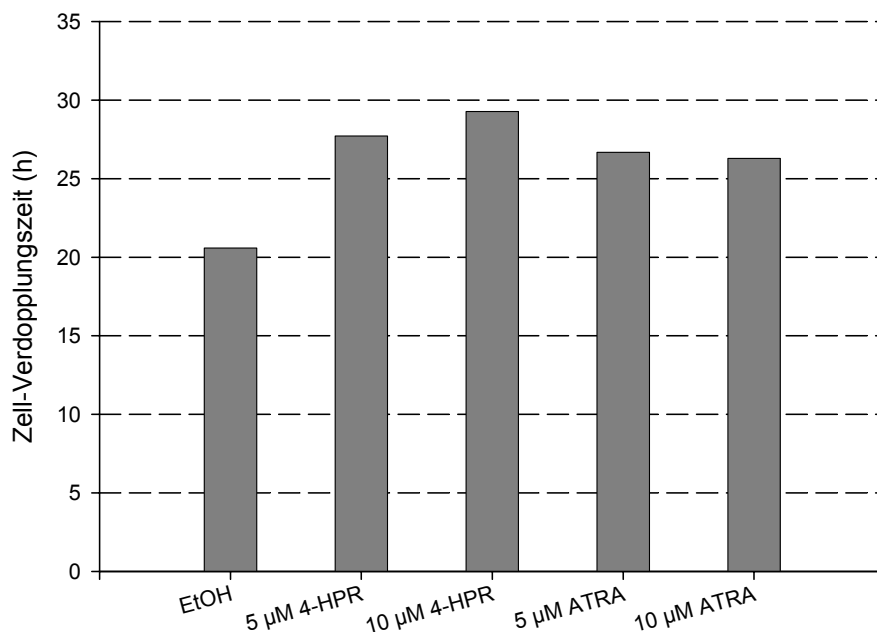


Abb. 4: Zell-Verdopplungszeiten der Zell-Linie A549 bei Inkubation mit Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure. Die Zellen wurden über 6 Tage entweder mit 5 bzw. 10 μM Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure inkubiert und die Zellzahl mittels Coulter Counter täglich bestimmt. In der logarithmischen Wachstumsphase zwischen Tag 2 und Tag 4 wurde die Zell-Verdopplungszeit berechnet. Die Ergebnisse sind als Absolutwerte im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

III.4 Reversibilität der Wachstumshemmung von Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure

Die Prüfung auf Reversibilität der wachstumshemmenden Wirkung von Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure erfolgte nach folgender Versuchsanordnung. Nach Inkubation der Zell-Linie A549 in Zellkulturflaschen (50 cm^3) mit $10\text{ }\mu\text{M}$ Fenretinid oder $10\text{ }\mu\text{M}$ *All-trans*-Retinsäure für 6 Tage wurden die Zellen in R-10 gewaschen und in je zwei Versuchsansätze geteilt. Dabei wurden die Zellen in einer Dichte von je 1×10^4 Zellen/ml in 24-well Platten ausgesät. In einem Versuchsansatz wurden die Zellen jetzt in R-10 über 6 Tage inkubiert. Im zweiten Versuchsansatz wuchsen die Zellen weiterhin mit $10\text{ }\mu\text{M}$ des jeweils zuvor verwandten Retinoids in R-10. Die Zellzahl wurde in beiden Versuchsansätzen täglich mittels Coulter Counter berechnet. Die Ergebnisse für Fenretinid sind in Abbildung 5 dargestellt.

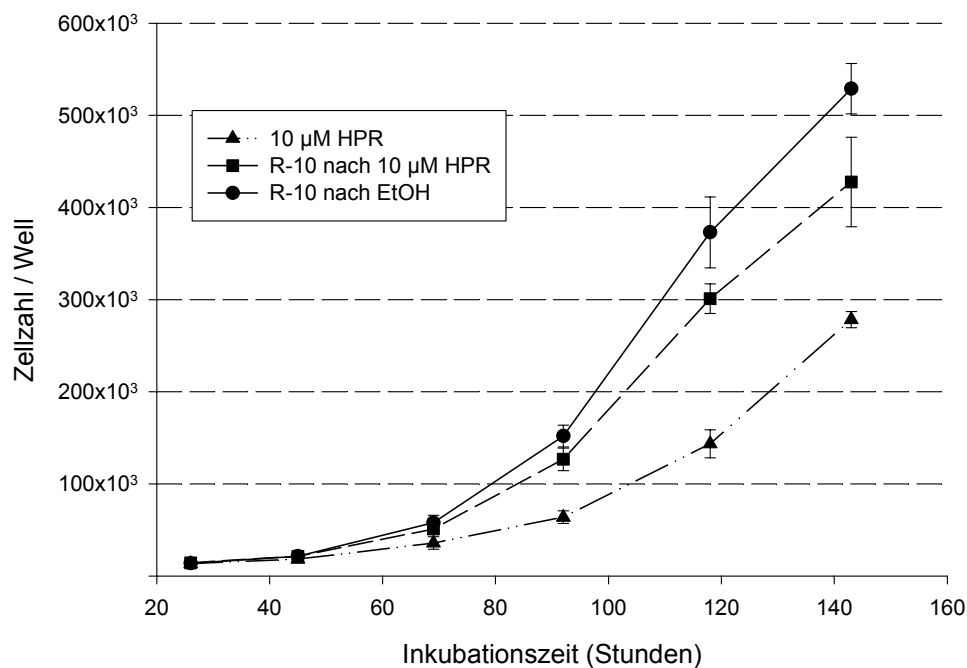


Abb. 5: Wachstumskinetik von A549 nach Inkubation mit $10\text{ }\mu\text{M}$ Fenretinid für 6 Tage. Die Zellen wurden erneut ausgesät und entweder mit R-10 oder weiter mit $10\text{ }\mu\text{M}$ Fenretinid inkubiert. Die Zellzahl wurde über 6 Tage täglich mittels Coulter Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

Als Maß der Wachstumsgeschwindigkeit wurde die Zell-Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen zwischen Tag 2 und Tag 4 berechnet. Nach Inkubation über 6 Tage mit 10 μM Fenretinid und anschließendem Wachstum in R-10 reduziert sich die Zell-Verdopplungszeit auf 19h und gleicht sich damit der Verdopplungszeit der Kontrolle (EtOH 1%) mit 18h an (Abbildung 6). Die Zell-Verdopplungszeit bleibt mit 24 h im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt, wenn die Zellen weiterhin unter 10 μM Fenretinid wachsen.

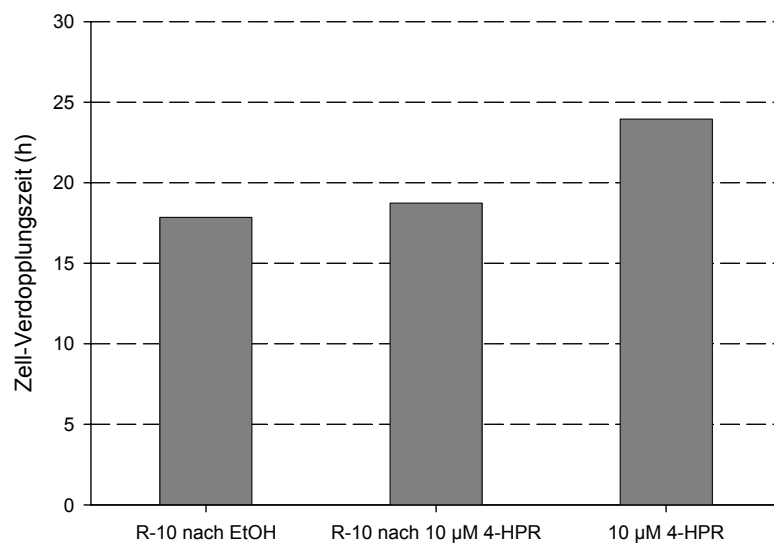


Abb. 6: Zell-Verdopplungszeiten der Zell-Linie A549 nach Inkubation mit 10 μM Fenretinid über 6 Tage. Die Zellen wurden erneut ausgesät und entweder mit R-10 oder weiterhin mit 10 μM Fenretinid inkubiert. Die Zellzahl wurde täglich mittels Coulter Counter bestimmt und die Zell-Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase berechnet. Die Ergebnisse sind als Absolutwerte im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der Zell-Linie A549 nach Inkubation mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure über 6 Tage. Die Zellen wurden wie oben beschrieben erneut ausgesät und entweder mit R-10 oder weiterhin mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure für 6 Tage inkubiert und die Zellzahl täglich mittels Coulter Counter bestimmt.

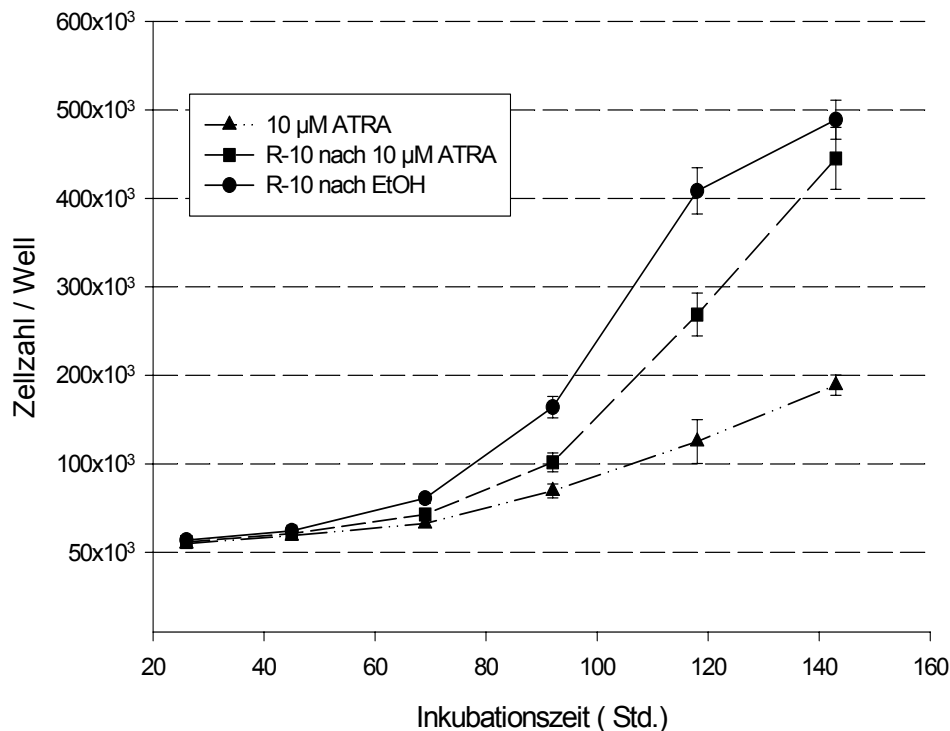


Abb. 7: Wachstumskinetik von A549 nach Inkubation mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure über 6 Tage. Die Zellen wurden erneut ausgesät und entweder mit R-10 oder weiterhin mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure inkubiert. Die Zellzahl wurde über 6 Tage täglich mittels Coulter Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

Auch hier wurde die Wachstumsgeschwindigkeit in Form der Zell-Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase zwischen Tag 2 und Tag 4 berechnet. Nach Inkubation mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure über 6 Tage und anschließendem Wachstum der Zellen in R-10 gleicht sich die Zell-Verdopplungszeit mit 18 h der Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolle mit einer Verdopplungszeit von 18 h wieder an. Im Gegensatz dazu bleibt das Wachstum bei weiterer Inkubation mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure über 6 Tage mit 25 h gegenüber der Kontrolle verlangsamt (Abbildung 8).

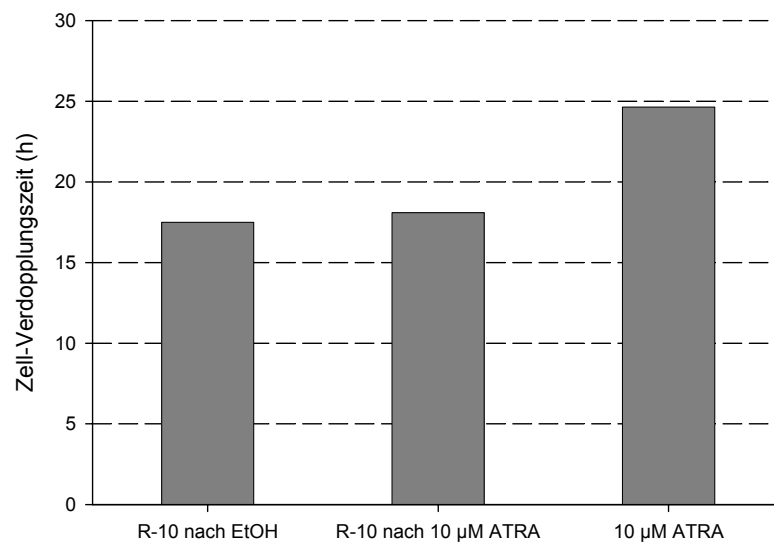


Abb. 8: Zell-Verdopplungszeiten der Zell-Linie A549 nach Inkubation mit 10 µM All-*trans*-Retinsäure über 6 Tage. Die Zellen wurden erneut ausgesät und entweder mit R-10 oder weiterhin mit 10 µM All-*trans*-Retinsäure inkubiert. Die Zellzahl wurde täglich mittels Coulter Counter bestimmt und die Zell-Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase berechnet. Die Ergebnisse sind als Absolutwerte im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

III.5 Wachstumshemmung durch Fenretinid in Abhängigkeit verschiedener Zellkultur-Bedingungen

III.5.1 Medientausch

Der Verbrauch an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren bei einer Inkubationszeit über 6 Tage kann die Wachstumshemmung einer Substanz wie Fenretinid beeinflussen. Daher wurde die Zell-Linie A549 in zwei parallelen Versuchsansätzen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml ausgesät und mit steigenden Konzentrationen Fenretinid über 6 Tage inkubiert. Während in dem einen Versuchsansatz am 3. Tag nach Inkubationsbeginn das Kulturmedium bestehend aus R-10 und der entsprechenden Konzentration an Fenretinid ausgetauscht wurde, wuchsen die Zellen in dem zweiten Versuchsansatz über 6 Tage ohne jegliche Erneuerung des Kulturmediums. In Abbildung 9 ist das Wachstum von A549 unter steigenden Konzentrationen Fenretinid im Vergleich der beiden Versuchsansätze dargestellt. Dabei lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Wachstumshemmung durch Fenretinid nach 6 Tagen Inkubationszeit zwischen beiden Versuchsansätzen feststellen.

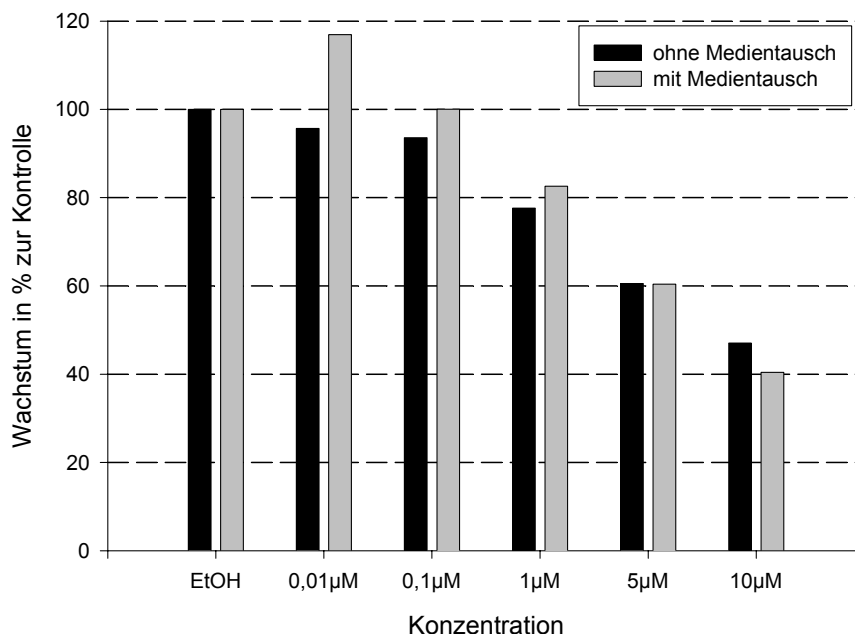


Abb. 9: Vergleich der Wachstumshemmung von A549 unter Fenretinid und Ethanol 1% als Kontrolle mit und ohne Medientausch. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/well ausgesät und mit Fenretinid inkubiert. In einem der Versuchsansätze wurde nach 3 Tagen das Medium plus Fenretinid komplett erneuert. Die Ergebnisse sind als Wachstum in Prozent zur Kontrolle dargestellt.

III.5.2 Variation der Zellzahl

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der eingesetzten Zellzahl auf die Wachstumshemmung durch Fenretinid untersucht. Hierzu wurde die Zell-Linie A549 in einer Dichte von 1×10^4 , 5×10^3 oder 1×10^3 Zellen/ml ausgesät und über 6 Tage mit 5 oder 10 μM Fenretinid inkubiert. Die Ergebnisse zeigen bei 1×10^4 Zellen/well ein Wachstum unter 10 μM Fenretinid von 48% im Vergleich zur Kontrolle. Werden 5×10^3 Zellen/well eingesetzt, erreicht das Wachstum 27% und 23% bei 1×10^3 Zellen/well im Vergleich zur Kontrolle (EtOH). Abbildung 10 zeigt die ermittelten Ergebnisse.

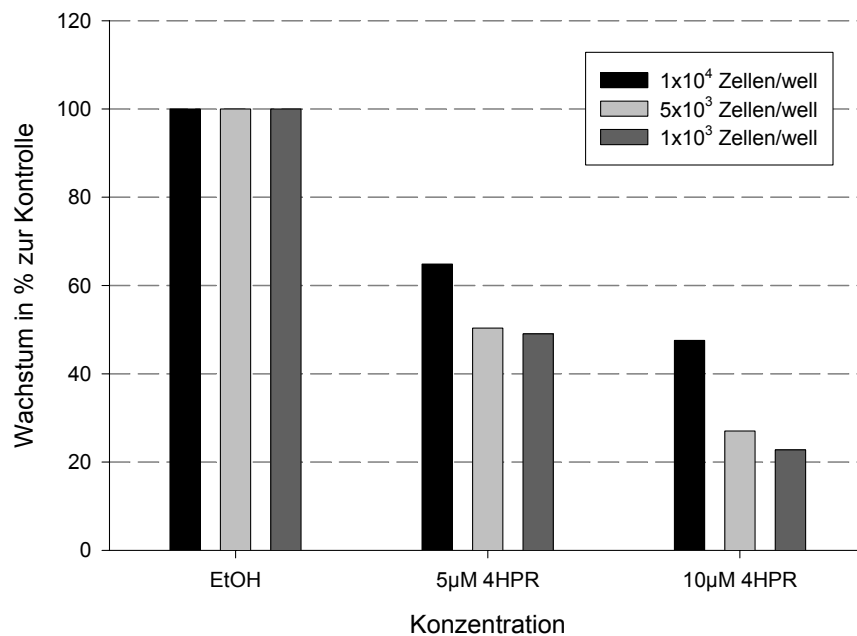


Abb. 10: Vergleich des Wachstums von A549 unter Fenretinid bei Variation der eingesetzten Zellzahl. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 , 5×10^3 oder 1×10^3 Zellen/well ausgesät und für 6 Tage mit 5 oder 10 μM Fenretinid inkubiert. Die Zellzahl wurde mittels Coulter Coulter ermittelt. Die Ergebnisse sind als Wachstum in Prozent zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

III.6 Wachstum und Morphologie der Zellen unter Fenretinid *All-trans*-Retinsäure in Abhängigkeit vom Zellkultur-Medium

In diesen Versuchen wurde das Wachstum und die Morphologie der Zell-Linie A549 unter Fenretinid in Zell-Kultur-Medien mit unterschiedlichem Serumgehalt untersucht. Dafür wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in Gewebekulturflaschen (50 cm^3) ausgesät und in unterschiedlichen Zell-Kultur-Medien (ST-Medium, R-1, R-5 und R-10) mit entweder 5 oder 10 μM Fenretinid bzw. *All-trans*-Retinsäure über 48 h inkubiert. Bereits in R-10 Medium zeigen die Zellen nach 48 h morphologische Veränderungen unter 10 μM Fenretinid im Vergleich zur Kontrolle. In R-5 Medium sind diese Veränderungen deutlicher erkennbar und in den Abbildungen 11 a-c dargestellt. Unter 10 μM Fenretinid verändert sich die sonst ovale Form der Zellen in eine längliche Form. Bei einigen Zellen bilden sich dünne Fortsätze aus. Auch unter 10 μM *All-trans*-Retinsäure lassen sich diese morphologischen Veränderungen in geringerer Ausprägung im Vergleich zu Fenretinid nach 48 h nachweisen. Des Weiteren fallen unter 10 μM Fenretinid im Zytoplasma kleine Vakuolen auf, die sowohl unter 10 μM *All-trans*-Retinsäure als auch in der Kontrolle nicht zu finden sind.

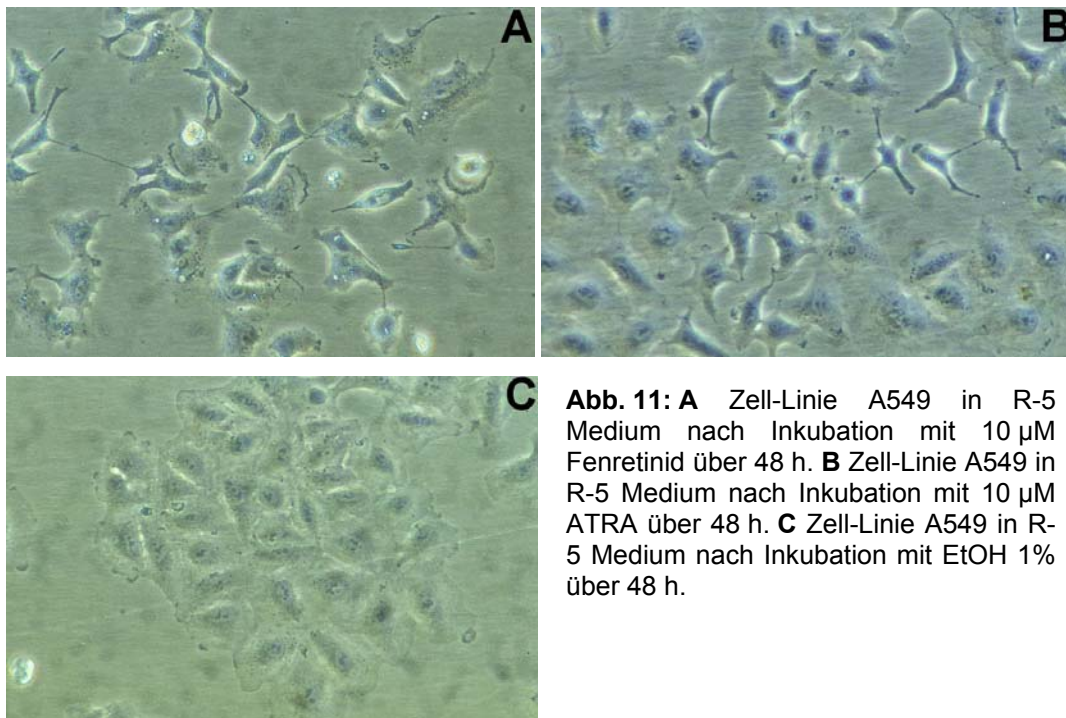


Abb. 11: **A** Zell-Linie A549 in R-5 Medium nach Inkubation mit 10 μM Fenretinid über 48 h. **B** Zell-Linie A549 in R-5 Medium nach Inkubation mit 10 μM ATRA über 48 h. **C** Zell-Linie A549 in R-5 Medium nach Inkubation mit EtOH 1% über 48 h.

Mit sinkender Serum-Konzentration der Zell-Kultur-Medien werden die morphologischen Veränderungen ausgeprägter. In Abbildung 12 a-e sind die Zellen in ST-Medium nach Inkubation mit entweder 5 oder 10 μM Fenretinid bzw. All-*trans*-Retinsäure abgebildet. Hierbei fällt auf, dass unter 10 μM Fenretinid alle Zellen abgelöst und nicht mehr vital sind. Des Weiteren sind unter 5 μM Fenretinid intrazytoplasmatisch Vakuolen sichtbar, die sowohl unter All-*trans*-Retinsäure als auch in der Kontrolle (EtOH 1%) nicht zu finden sind.

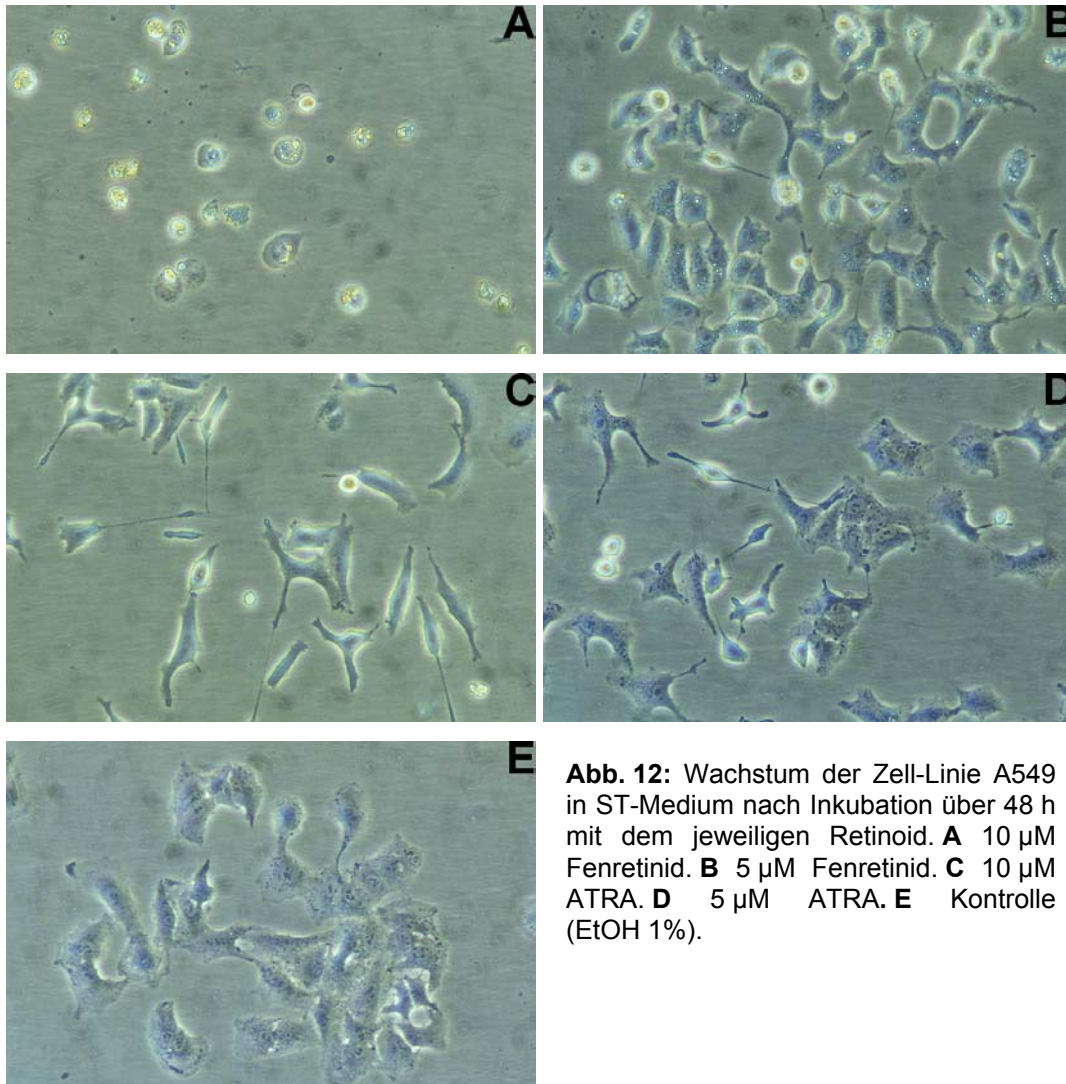


Abb. 12: Wachstum der Zell-Linie A549 in ST-Medium nach Inkubation über 48 h mit dem jeweiligen Retinoid. **A** 10 μM Fenretinid. **B** 5 μM Fenretinid. **C** 10 μM ATRA. **D** 5 μM ATRA. **E** Kontrolle (EtOH 1%).

III.7 Langzeitstimulation mit Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure

Für die Untersuchung von Langzeiteffekten von Fenretinid und All-*trans*-Retinsäure wurde die Zell-Linie A549 mit 5 μ M Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure inkubiert. Nach 3 Wochen Inkubationszeit wurde die Konzentration der Retinoide auf jeweils 10 μ M erhöht und die Zellen für weitere 8 Wochen inkubiert. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden über den gesamten Zeitraum dokumentiert. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 11 Wochen wurden die Zellen für 1 Jahr in flüssigem N₂ gelagert, bevor sie aufgetaut und zur Überprüfung der Stabilität der Langzeiteffekte erneut mit jeweils 10 μ M Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure inkubiert wurden. Einen Überblick über den Verlauf der Inkubationszeit mit den beobachteten Effekten gibt Tabelle 4.

| Linie | Retinoid | Inkubationszeit | Passagierung | Morphologie |
|-------|------------------------------|-----------------|-----------------------|----------------|
| A549 | 5 μ M Fenretinid | 1. Woche | 2x | Keine Änderung |
| | | 2. Woche | 2x | Spindelförmig |
| | | 3. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | 10 μ M Fenretinid | 4-6. Woche | Nach 6. Woche | Spindelförmig |
| | | 6-9. Woche | 1x/Woche | Spindelförmig |
| | | 10. Woche | 2x | Spindelförmig |
| | | 11. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | Nach 10 Passagen eingefroren | | Aufgetaut nach 1 Jahr | |
| | 10 μ M Fenretinid | 1. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | | 2-3. Woche | 2x/Woche | Spindelförmig |
| A549 | 5 μ M ATRA | 1. Woche | 2x | Keine Änderung |
| | | 2. Woche | 2x | Spindelförmig |
| | | 3. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | 10 μ M ATRA | 4. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | | 5-6. Woche | Nach 6. Woche | Spindelförmig |
| | | 7-9. Woche | 1x/Woche | Spindelförmig |
| | | 10. Woche | 2x | Spindelförmig |
| | | 11. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | Nach 13 Passagen eingefroren | | Aufgetaut nach 1 Jahr | |
| | 10 μ M ATRA | 1. Woche | 1x | Spindelförmig |
| | | 2-3. Woche | 2x/Woche | Spindelförmig |

Tab. 4: Auswertung der Langzeitstimulation

III.8 Apoptoseinduktion durch Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure

Mit dem TUNEL-Assay sollte die Apoptoseinduktion nach Stimulation mit Fenretinid oder *All-trans*-Retinsäure untersucht werden. In einem ersten Versuchs-Ansatz wurde die Zell-Linie A549 in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/well mit 5 μ M Fenretinid oder *All-trans*-Retinsäure über 2 Tage inkubiert. Dieser Ansatz mit einer mittleren Konzentration der Retinoide und einer Inkubationszeit über 2 Tage erfolgte mit der Überlegung, Nekrose-Induktion zu vermeiden. Da aber wie aus Tabelle 3 ersichtlich eine Apoptoseinduktion nicht nachgewiesen werden konnte, wurde der Versuchsansatz verändert. In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Zell-Linie A549 in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in Gewebekulturflaschen (50 cm³) ausgesät und entweder mit 10 μ M Fenretinid oder *All-trans*-Retinsäure inkubiert. Nach Inkubation über 5 und 6 Tage wurden Zytozentrifugen-Präparate hergestellt und der TUNEL-Assay an diesen Präparaten durchgeführt. Die Auswertung des Assay erfolgte sowohl im Lichtmikroskop als auch mit einem Phasenkontrast-Mikroskop. In jedem Präparat wurden die Anzahl positiv gefärbter Zellen unter 3000 Zellen ausgezählt. Dabei konnten positiv gefärbte Zellen mit unterschiedlicher Morphologie festgestellt werden. Sowohl nach Inkubation mit Fenretinid als auch nach Inkubation mit *All-trans*-Retinsäure und in der Kontrolle (EtOH 1%) wiesen einige Zellen ringförmige TUNEL-positiv gefärbte Strukturen im Zytoplasma auf (Abb. 13 A). Bei anderen Zellen konnten in der Mitte der Zellen zwei parallel angeordnete längliche TUNEL-positive Strukturen entdeckt werden (Abb. 13 B). Wieder andere Zellen wiesen kompakte, rundliche TUNEL-positive Strukturen im Zytoplasma auf (Abb. 13 A, C). Nach Inkubation über 6 Tage mit 10 μ M Fenretinid wurden auch homogen TUNEL-positive Zellen in den Präparaten identifiziert (Abb. 13 D).

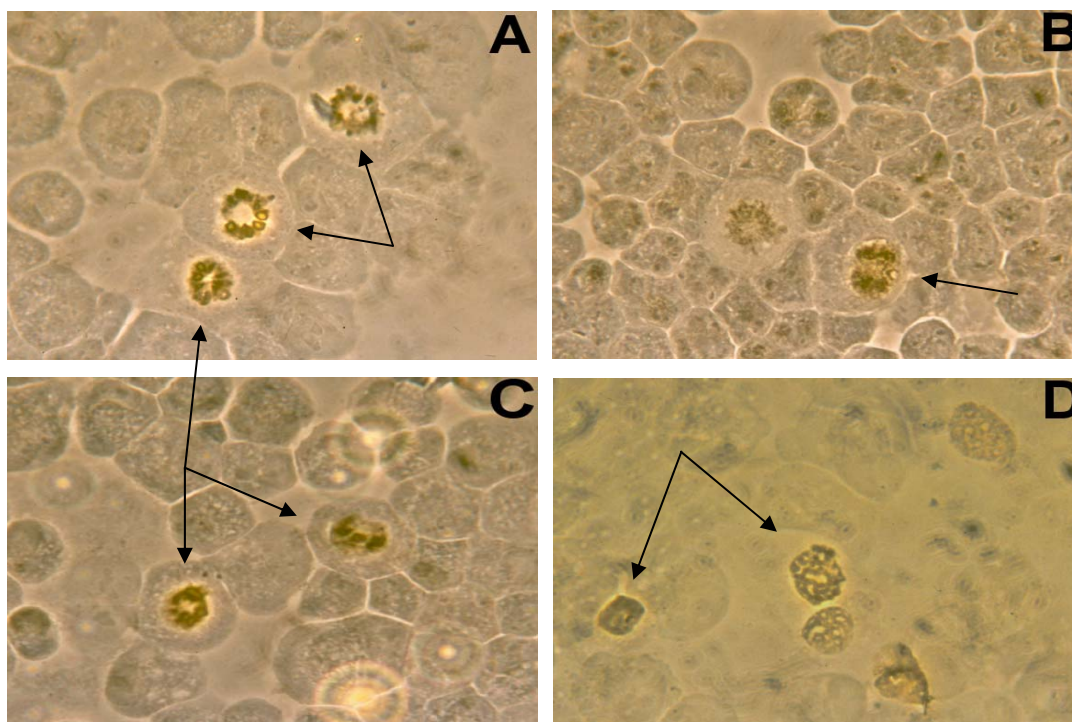






Abb. 13: Unterschiedliche Morphologien der TUNEL-positiven Zellen. **A** Ringförmige oder kompakte, rundliche Strukturen. **B** Längliche, parallel angeordnete Strukturen. **C** Kompakte, rundliche Strukturen. **D** Homogen TUNEL-positive Zellen.

Die Auswertung der TUNEL-Assay Präparate erfolgt getrennt nach den oben gezeigten Morphologien. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Im ersten Versuchansatz konnte keine Apoptoseinduktion nach Inkubation mit 5 μ M Fenretinid festgestellt werden. In allen Präparaten wurden mit unterschiedlicher Anzahl die ringförmigen und rundlichen TUNEL-positiven Strukturen gezählt. Nach Inkubation mit 10 μ M Fenretinid kann eine Steigerung der homogen TUNEL-positiven Zellen auf 5% gegenüber 10 μ M All-*trans*-Retinsäure und der Kontrolle (EtOH 1%) festgestellt werden.

| Zellen | 5x10 ⁴ Zellen/ml, 2d | | | 1x10 ⁴ Zellen/ml, 5d | | | 1x10 ⁴ Zellen/ml, 6d | | |
|---|---------------------------------|------|-------|---------------------------------|-------|-------|---------------------------------|-------|-------|
| | EtOH | ATRA | HPR | EtOH | ATRA | HPR | EtOH | ATRA | HPR |
|  | 17 | 16 | 1 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 0,6% | 0,5% | 0,03% | 0% | 0% | 0,2% | 0% | 0% | 0% |
|  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0,13% | 0% | 0% | 0% |
|  | 24 | 39 | 30 | 2 | 2 | 4 | 18 | 3 | 0 |
| | 0,8% | 1,3% | 1,0% | 0,06% | 0,06% | 0,12% | 0,54% | 0,09% | 0% |
|  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 181 |
| | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 5,43% |
| Gesamt | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tab. 5: Auswertung des TUNEL-Assay

III.9 IGFBP-3 Konzentration in konditionierten Medien

Um eine Veränderung der IGFBP-3 Konzentration im Medium unter Stimulation mit Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure nachweisen zu können, wurden die IGFBP-3 Konzentrationen mittels eines Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) gemessen. Dazu wurden die Zellen mit 5 oder 10 μM Fenretinid bzw. *All-trans*-Retinsäure über 6 Tage inkubiert. Der ELISA wurde dann mit dem Zell-Kultur-Überstand nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Ergebnisse weisen bei A549, EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 keine signifikante Veränderung der IGFBP-3 Konzentration nach Stimulation mit 5 oder 10 μM Fenretinid auf (Abbildung 14). Unter Stimulation mit *All-trans*-Retinsäure lässt sich bei den Zell-Linien A549 und EPLC-32M1 eine Steigerung der IGFBP-3 Konzentration zeigen. Bei der Zell-Linie LCLC-97TM1 ist keine Steigerung der IGFBP-3 Konzentration unter *All-trans*-Retinsäure zu erkennen.

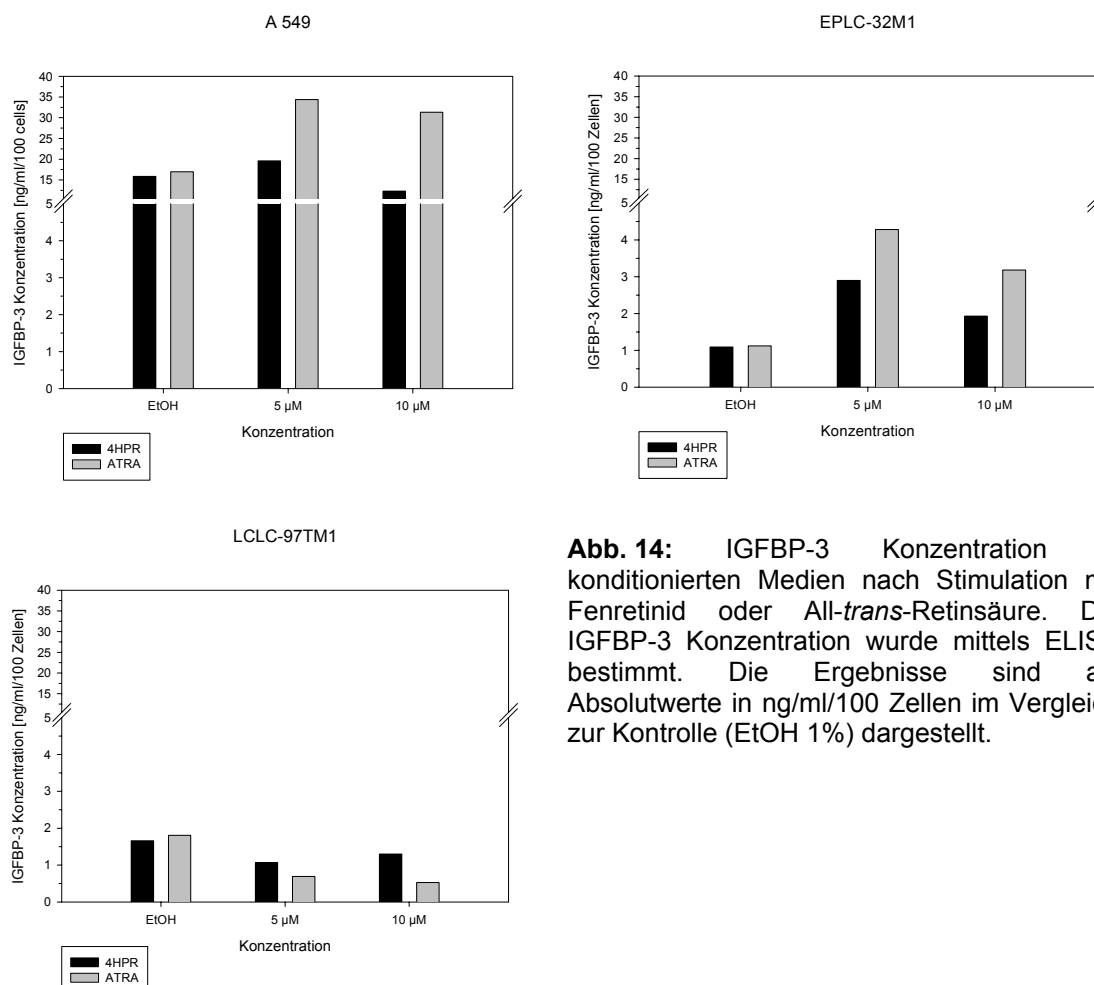


Abb. 14: IGFBP-3 Konzentration in konditionierten Medien nach Stimulation mit Fenretinid oder *All-trans*-Retinsäure. Die IGFBP-3 Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Absolutwerte in ng/ml/100 Zellen im Vergleich zur Kontrolle (EtOH 1%) dargestellt.

III.10 Immunzytochemische Färbung von IGFBP-3

Der immunzytochemische Nachweis von IGFBP-3 erfolgte an Objektträgerkulturen der Zell-Linie A549 nach Inkubation mit 10 μ M Fenretinid oder 10 μ M All-*trans*-Retinsäure über 48 h. Als Kontrolle zur IGFBP-3 Färbung diente Kaninchen-Immunglobulin G als Primär-Antikörper. Verglichen mit den Präparaten nach Stimulation mit All-*trans*-Retinsäure und der Kontrolle (EtOH 1%) zeigt sich unter 10 μ M Fenretinid sowohl in der IGFBP-3 Färbung als auch in der Kontrolle eine intensivere Hintergrund-Färbung. Davon abzugrenzen sind runde bis ovale, scharf begrenzte Areale höchster Intensität der Braun-Färbung im Zellkern, besonders deutlich nach Stimulation von A549 mit 10 μ M Fenretinid (Abbildung 15 Pfeil). Die Braun-Färbung ist die spezifische Färbung biotinylierter IGFBP-3 Antikörper mit Diaminobenzidin (DAB) und ist als Kumulation von IGFBP-3 Protein zu interpretieren.

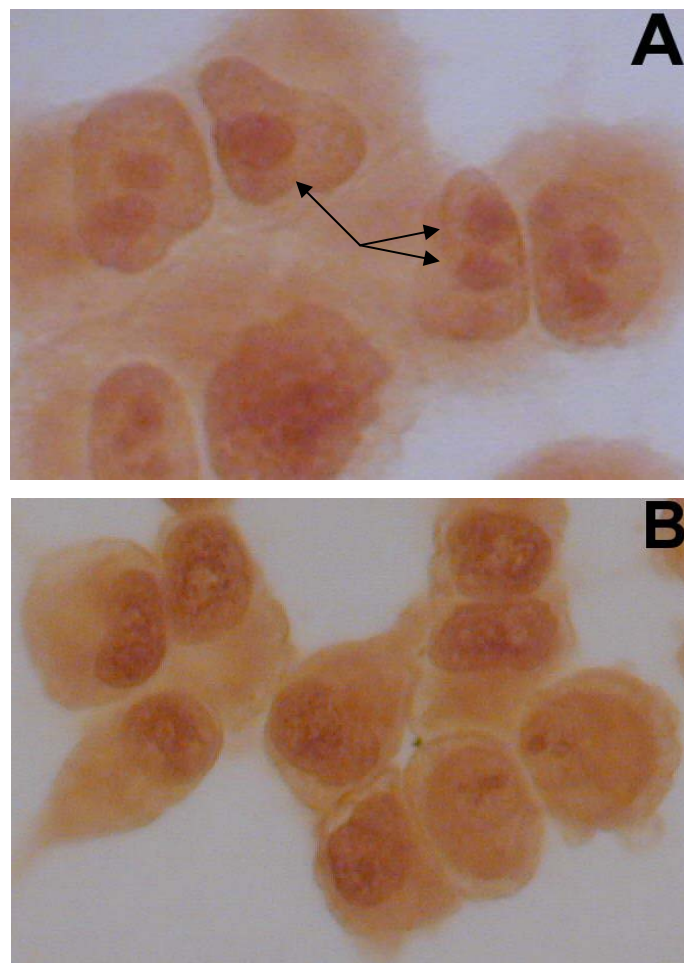


Abb. 15: IGFBP-3 Färbung der Zell-Linie A549 nach Inkubation mit 10 μ M Fenretinid über 48 h. **A** IGFBP-3 Primär-Antikörper. **B** Kontroll-Färbung mit Kaninchen-IgG als Primärantikörper.

Nach Stimulation von A549 mit 10 μ M All-*trans*-Retinsäure zeigt sich, verglichen mit 10 μ M Fenretinid, eine geringere Hintergrundfärbung des Zytoplasmas der Zellen. Auch hier sind vereinzelt im Zell-Kern Areale mit spezifisch angefärbtem IGFBP-3 erkennbar (Abbildung 16).

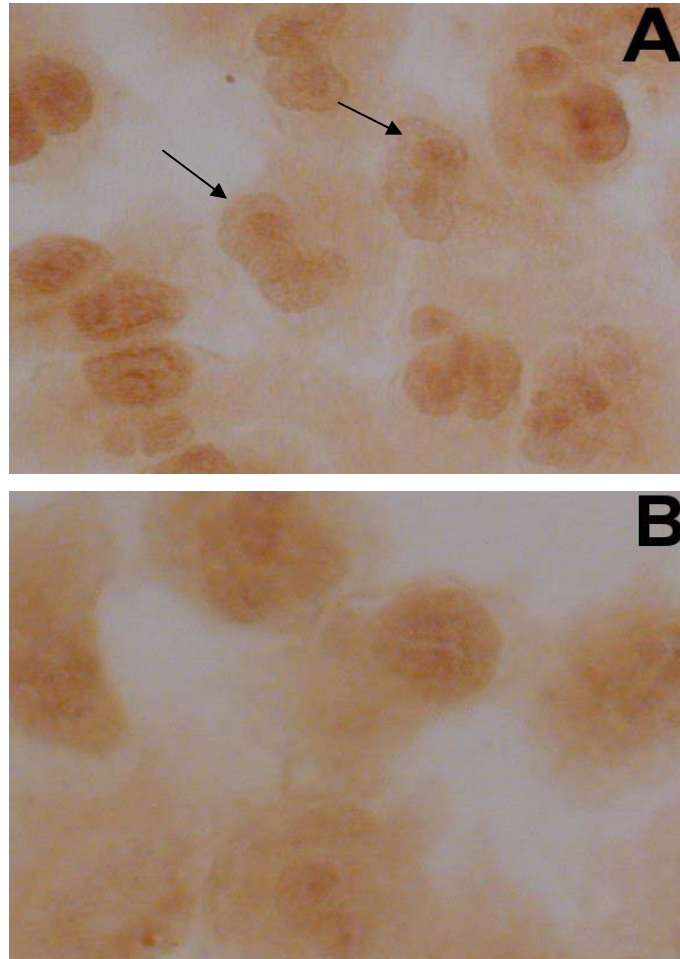


Abb. 16: Immunzytochemische Färbung von IGFBP-3 bei A549 nach Stimulation mit 10 μ M All-*trans*-Retinsäure für 48 h. **A** IGFBP-3 Primär-Antikörper. Mit dem Pfeil sind ovale, scharf begrenzte Areale mit spezifischer IGFBP-3 Färbung im Kern der Zellen gekennzeichnet. **B** Kontroll-Färbung mit Kaninchen-IgG als Primärantikörper.

Nach Stimulation von A549 mit EtOH 1% zeigt sich verglichen mit dem Kontrollpräparat im Kern eine intensivere Braun-Färbung. Es lassen sich aber keine Areale finden, die als spezifische IGFBP-3 Anfärbung gewertet werden können (Abbildung 17).

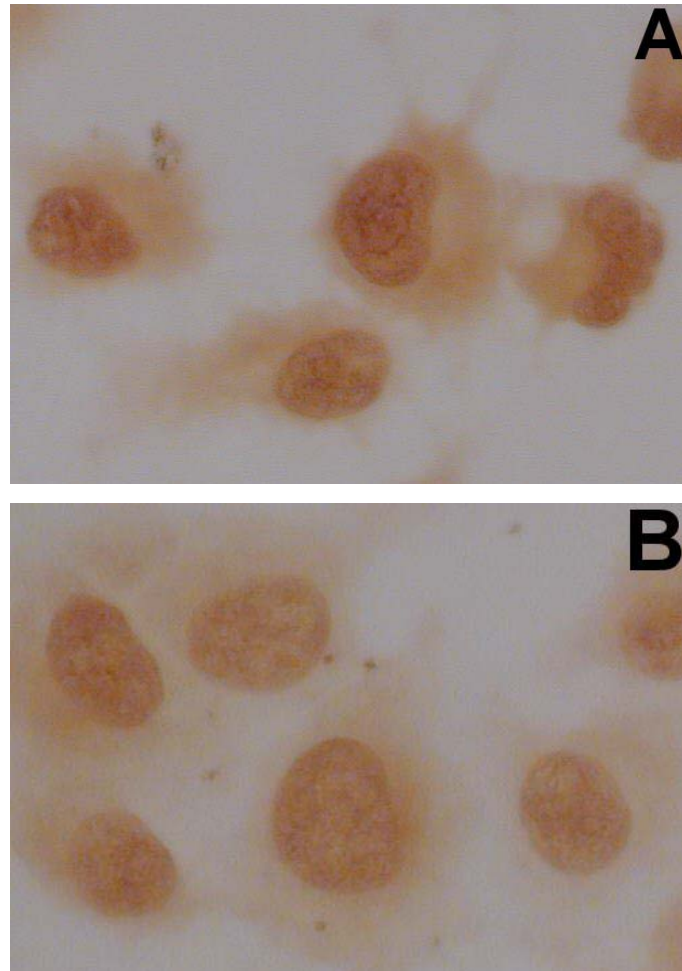


Abb. 17: Immunzytochemische Färbung von IGFBP-3 bei A549 nach Stimulation mit EtOH 1% für 48 h. **A** IGFBP-3 Primär-Antikörper. **B** Kontroll-Färbung mit Kaninchen-IgG als Primärantikörper.

III.11 mRNA-Expression von IGFBP-3

Die Änderung der mRNA-Expression von IGFBP-3 nach Stimulation mit 10 μ M Fenretinid oder *All-trans*-Retinsäure über 48 h wurde in einer RT-PCR ermittelt. Verwendet wurden die Zell-Linien EPLC-32M1, LCLC-97TM1 und A549. Als Referenzgen diente hierbei die Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Abbildung 18 zeigt die RT-PCR für IGFBP-3 und dem Referenzgen GAPDH.

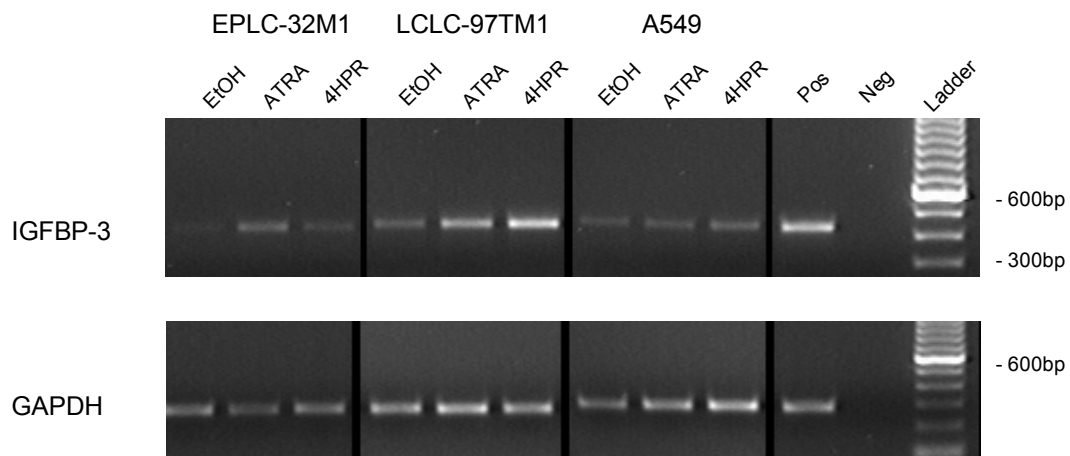


Abb. 18: RT-PCR für IGFBP-3 und GAPDH (Referenzgen) bei den Zell-Linien EPLC-32M1, LCLC-97TM1 und A549.

Um eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression nach Stimulation mit Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure treffen zu können, wurden die Intensitäten der Banden mit der Software GelScan Pro 3.0 gemessen. Die Abbildung 19 zeigt die Quotienten aus der Bandenintensität der IGFBP-3 PCR und der Bandenintensität der GAPDH-PCR. Dabei lässt sich ein Anstieg der IGFBP-3 mRNA-Expression nach Stimulation aller Zell-Linien mit 10 μ M Fenretinid feststellen. Die IGFBP-3 mRNA Expression der Zell-Linien EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 wird nach Stimulation mit 10 μ M All-*trans*-Retinsäure ebenfalls gesteigert.

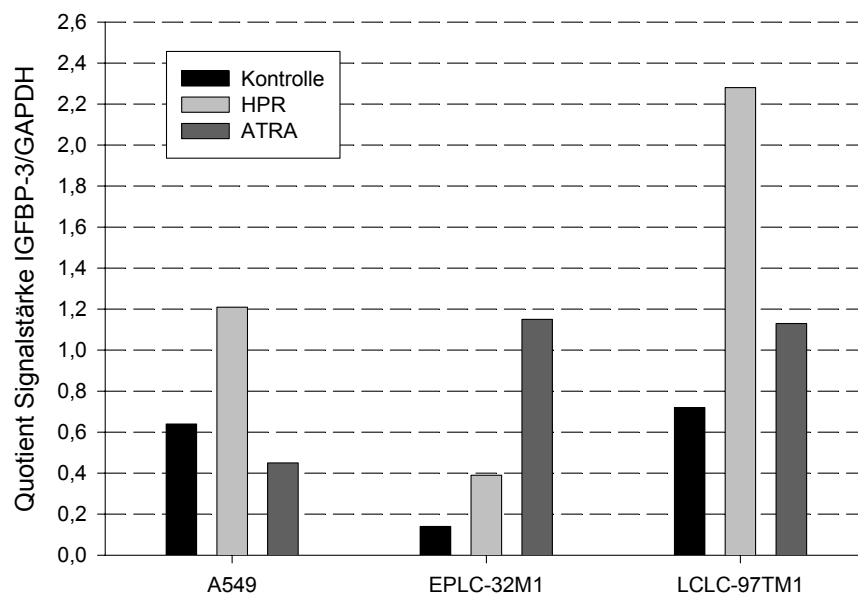


Abb. 19: Quotient der Bandenintensitäten der IGFBP-3 PCR und der GAPDH-PCR.

IV. Diskussion

Retinoide bilden wegen ihrer Bedeutung für die Proliferation und Differenzierung von Geweben, Immunmodulation und Embryonalentwicklung der Lunge eine interessante Substanzgruppe für die Chemoprävention und Therapie von Bronchialkarzinomen. In bisherigen Untersuchungen erweist sich *All-trans*-Retinsäure, Hauptmetabolit des Vitamin A, wegen seiner hohen Toxizität und den pharmakologischen Eigenschaften als wenig geeignet für die Therapie von Patienten (Smith et al. 1992).

Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass viele Bronchialkarzinomzell-Linien resistent gegenüber der wachstumsinhibierenden Wirkung von *All-trans*-Retinsäure sind, was einen therapeutischen Nutzen bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom in Frage stellt (Geradts et al. 1993). Darüber hinaus wird das Wachstum normaler Bronchialepithel-Zellen und einiger Bronchialkarzinomzell-Linien durch niedrige Konzentrationen von *All-trans*-Retinsäure stimuliert, während es durch hohe Konzentrationen im Wachstum gehemmt wird (Wan et al. 1997).

Auf der Suche nach geeigneten Retinoiden für die Chemoprävention und Therapie von Bronchialkarzinomen erweist sich N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (Fenretinid, HPR) mit seiner geringen Toxizität (Formelli et al. 1993a) als eine viel versprechende Substanz.

IV.1 Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomzell-Linien

IV.1.1 Wachstum von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien unter Fenretinid

Bei 9 der 12 getesteten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl nach Inkubation mit 10 μM Fenretinid über 6 Tage beobachtet werden. Dabei lag das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle zwischen 11% (LCLC-97TM1) und 61% (U1752). Die errechneten IC₅₀-Werte liegen im Bereich zwischen 3,3 μM (LCLC-97TM1) und >10 μM bei Zell-Linien, bei denen die Wachstumshemmung unter 50% liegt. Diese Konzentrationen liegen höher als die gemessene Plasma-Konzentration von 1 μM Fenretinid nach oraler Medikation mit 200 mg (0,51 mmol) Fenretinid/Tag über 5 Jahre bei Patienten mit Mamma-Karzinom (Formelli et al. 1993a). Dennoch ist anzunehmen, dass Konzentrationen von >10 μM Fenretinid erreicht werden können, da sich Fenretinid in Geweben wie Leber und Brustdrüse anreichert (Hultin et al. 1986). Im Sekret der Brustdrüse wurde nach oraler Einnahme von 200 mg Fenretinid/Tag über 15 Tage eine Konzentration von >10 μM Fenretinid gemessen (Formelli et al. 1993a). Über die Konzentration in Lungengewebe gibt es bisher keine Daten.

Im Vergleich zu All-*trans*-Retinsäure hemmt Fenretinid das Wachstum bei Zell-Linien, die gegen All-*trans*-Retinsäure resistent sind. Bei den Zell-Linien EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 lässt sich nach Inkubation mit 10 μM All-*trans*-Retinsäure über 6 Tage keine signifikante Wachstumshemmung nachweisen. Im Gegensatz dazu erreichen die Zell-Linien EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 nach Inkubation mit 10 μM Fenretinid ein Wachstum von 43% bzw. 23% im Vergleich zur Kontrolle.

Zou et al. (Zou et al. 1998) veröffentlichten Ergebnisse über das Wachstum von 10 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien nach Inkubation mit 1 μM und 10 μM Fenretinid über 5 Tage. Unter den getesteten Zell-Linien waren auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zell-Linien A549, NCI-H157 und NCI-H596. In der Arbeit von Zou et al. erreichen die Zell-Linien im Vergleich zur Kontrolle ein Wachstum von 5,4% (A549), 6,6% (NCI-H157) und 0,3% (NCI-H596) nach Inkubation mit 10 μM Fenretinid über 5 Tage. In der vorliegenden Arbeit beträgt das Wachstum nach Inkubation mit 10 μM Fenretinid über 6 Tage 47% (A549), 52% (NCI-H157) und

100% (NCI-H596). Für die unterschiedlichen Ergebnisse von Zou et al. und der vorliegenden Arbeit kann es mehrere Gründe geben.

1. Eine Ursache kann in den unterschiedlichen Methoden liegen, die Anzahl lebender Zellen in den Wachstumsversuchen zu bestimmen. Zou et al. verwenden eine von Kueng et al. beschriebene Crystal-Violett Färbung. (Kueng et al. 1989). Hierbei werden die Zellkerne lebender Zellen mit Crystal-Violett angefärbt. Anschließend wird das Crystal-Violett der angefärbten Zellkerne wieder mit Essigsäure gelöst und die Absorption gemessen. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption und der Zellzahl (Gillies et al. 1986). In der vorliegenden Arbeit wird die Zahl der Zellen nach dem Coulter-Prinzip ermittelt. Dabei ist eine Unterscheidung zwischen vitalen Zellen, toten Zellen und anderen korpuskulären Bestandteilen nicht möglich. Bei der Aufbereitung der Zellen für die Messung wurde zwar das Medium aus den Wells abgesaugt und damit die bereits abgelösten apoptotischen Zellen entfernt. Dennoch kann durch Zählung nicht abgelöster Zellen, die sich im Prozess der Apoptose befinden und anderer amorpher Partikel ein falsch hohes Ergebnis mit dem Coulter Counter gemessen werden.
2. Eine weitere Einflussgröße auf das Ergebnis der Wachstumsversuche sind die verwendeten Wachstumsmedien. In der vorliegenden Arbeit wird als Medium RPMI 1640 mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS), im Weiteren R-10 genannt, verwendet. Dagegen werden in der Arbeit von Zou et al. (Zou et al. 1998) die Zellen in einer Suspension (1:1) von DMEM und Ham's F12 Medium mit 5% fetalem Kälberserum kultiviert. Das Medium enthält damit 50% weniger Kälberserum als das in der vorliegenden Arbeit verwendete R-10. Da Retinoide im Serum an Albumin gebunden transportiert werden (Davis et al. 1993), ist anzunehmen, dass mit steigender Serum-Konzentration das vorhandene Fenretinid vermehrt an Albumin gebunden vorliegt. Wenn Fenretinid an Albumin gebunden ist, kann es nicht mit Rezeptoren interagieren ist deshalb nicht biologisch aktiv (Avis et al. 1995). Darüber hinaus enthält das fetale Kälberserum eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet-derived Growth Factor (PGF) und Transforming Growth Factor α and β (TGF). Diese Wachstumsfaktoren steuern das Wachstum der Zellen und können die Wachstumshemmung von Fenretinid oder All-*trans*-Retinsäure beeinflussen (Wan et al. 1997). Gerade nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzell-Linien zeichnen sich durch eine hohe Rezeptordichte für

Epidermal Growth Factor (EGF) (Gazdar et al. 1986) aus. Bei hohen EGF-Konzentrationen im Serum werden daher gerade nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzell-Linien zum Wachstum angeregt, was dann die Ergebnisse von Wachstumsversuchen beeinflusst.

3. Als eine weitere Einflussgröße auf das Ergebnis von Wachstumsversuchen mit Fenretinid konnte in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit der Wachstumshemmung durch Fenretinid von der eingesetzten Zellzahl gezeigt werden. Bei einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml kann die Zell-Linie A549 unter $10 \mu\text{M}$ Fenretinid nur noch zu 47% im Vergleich zur Kontrolle proliferieren. Werden 5×10^3 Zellen/ml eingesetzt reduziert sich das Wachstum auf 27% und auf 23% bei 1×10^3 Zellen/ml im Vergleich zur Kontrolle. Die Absolutwerte dieser Wachstumsversuche zeigen ein proportional besseres Wachstum der Kontrollen in den Versuchen mit 5×10^3 und 1×10^3 Zellen/ml im Vergleich zu 1×10^4 Zellen/ml.

Die Gründe hierfür sind (1) in der Charakteristik des Wachstums von Zellen in Zell-Kultur zu suchen. Die Dynamik des Zell-Wachstums ist abhängig von der Kontakt-Inhibition der Zellen untereinander. Dabei wird die weitere Zell-Teilung bei zunehmender Dichte in der Zell-Kultur durch Zell-Zell-Interaktionen gehemmt. Je höher die eingesetzte Zellzahl bei Versuchsbeginn ist, desto schneller kommt es in den Wachstumsversuchen zu einer Kontaktinhibition. Insbesondere das Wachstum der Kontrollen wird frühzeitig verlangsamt, während die Zellen unter Fenretinid erst spät durch Kontaktinhibition im Wachstum gehemmt werden.

(2) Die Wachstumshemmung durch Fenretinid erfolgt dosisabhängig. Aus einer geringeren Zellzahl resultiert ein größeres Angebot an Fenretinid für die einzelne Zelle und damit möglicherweise eine stärkere Wachstumshemmung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Fenretinid das Wachstum einer Vielzahl von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien *in vitro* hemmt. Dabei ist die Wachstumshemmung von der Serum-Konzentration im Zellkultur-Medium, der Methode der Zellzahl-Bestimmung und der eingesetzten Zellzahl abhängig.

IV.1.2 Reversibilität der Wachstumshemmung bei A549

Da die Wachstumshemmung von All-*trans*-Retinsäure reversibel ist, d.h. die ursprüngliche Proliferationsrate wieder erreicht wird, sobald die Substanz dem Wachstumsmedium entzogen wird (Lovat et al. 1997), muss bei Patienten eine Dauertherapie mit All-*trans*-Retinsäure erfolgen. Nebenwirkungen wie trockene Haut und Schleimhäute, Cheilitis, Hypertriglyceridämie, Leber-Toxizität, Knochenschmerzen, Pseudotumor Cerebri (benigne intrakranielle Hypertonie) und das bei Patienten mit einer Promyelozyten-Leukämie (PML) vorkommende Retinsäure-Syndrom (Fieber, Ateminsuffizienz, Pleuraerguss und Ödeme) sprechen gegen eine Dauertherapie mit All-*trans*-Retinsäure (Smith et al. 1992, Tallman et al. 1994), (Warrell-RP et al. 1994, Lotan et al. 1996).

Die Reversibilität der Wachstumshemmung durch Fenretinid wurde bereits für maligne lymphatische und myeloische Zell-Linien, für Ovarial-Karzinomzell-Linien und für Mamma-Karzinom Zell-Linien beschrieben (Delia et al. 1993, Supino et al. 1996, Favoni et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Proliferationsrate der Zellen nach Entzug von Fenretinid wieder der ursprünglichen Proliferationsrate angleicht. Daher kann die Wachstumshemmung durch Fenretinid bei der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linie A549 als reversibel bezeichnet werden. Bei Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist deshalb eine Dauertherapie mit Fenretinid zu empfehlen. Bekannte Nebenwirkung bei Einnahme von Fenretinid ist vor allem eine Nachtblindheit, die sich bei 20% der Patienten entwickelt und bei Unterbrechung der Therapie spontan zurückbildet (Mariani et al. 1996). Neben der Nachtblindheit treten Hautveränderungen (19% d. F.), gastrointestinale Beschwerden (13% d.F.) sowie Veränderungen der Kornea (11% d. F.) auf (Camerini et al. 2001). Erste klinische Langzeitstudien bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom haben gezeigt, dass die Nebenwirkungen tolerabel sind und Fenretinid mit einer Dosis von 200 mg/d problemlos über einen längeren Zeitraum eingenommen werden kann (Formelli et al. 1993a). Daher spricht auch bei Patienten mit Bronchialkarzinom nichts gegen eine Dauertherapie mit Fenretinid in dieser Dosierung.

IV.2 Mechanismus der Wachstumshemmung durch Fenretinid

Mit den weiteren Versuchen sollte der Mechanismus der Wachstumshemmung durch Fenretinid genauer untersucht werden. Da Fenretinid das Wachstum von Zell-Linien hemmt, die gegenüber All-*trans*-Retinsäure resistent sind, stellen sich hier zwei Fragen:

1. Warum sind einige nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien resistent gegenüber der Wachstumshemmung durch All-*trans*-Retinsäure?
2. Wie kann Fenretinid das Wachstum dieser Zell-Linien dennoch hemmen?

Ad 1.) Für die Beantwortung der Frage wird zunächst auf den Signalweg der All-*trans*-Retinsäure eingegangen. Es anzunehmen, dass die Wachstumshemmung durch All-*trans*-Retinsäure über eine Autoinduktion von RAR β mit anschließender Sekretion von IGFBP-3 vermittelt wird (Gucev et al. 1996, Shang et al. 1999). Die fehlende Autoinduktion von RAR β ohne anschließende IGFBP-3 Sekretion scheinen dafür verantwortlich zu sein, dass einige nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzell-Linien resistent gegenüber der Wachstumshemmung durch All-*trans*-Retinsäure sind (Geradts et al. 1993, Zhang et al. 1994).

Ad 2.) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass die Wachstumshemmung durch Fenretinid nicht von der Sekretion des IGFBP-3 abhängig ist. Vielmehr folgt scheint hierbei IGFBP-3 einem intrakrinen Signalweg zu folgen. Ein Modell zu diesem Signalweg konnte anhand der Ergebnisse erarbeitet werden und wird im Detail vorgestellt und diskutiert.

Die Induktion von Apoptose stellt einen weiteren Aspekt im Mechanismus der Wachstumshemmung durch Fenretinid dar. Während All-*trans*-Retinsäure vor allem eine Differenzierung der Zellen induziert, wird für die Wachstumshemmung durch Fenretinid die Induktion von Apoptose verantwortlich gemacht. Auch bei den getesteten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien wird Apoptose durch Fenretinid induziert. Die Bedeutung der Apoptose für die Wachstumshemmung konnte aber nicht vollständig geklärt werden. Vielmehr scheinen auch für die Wachstumshemmung durch Fenretinid die Induktion von Differenzierung und Zytostase eine Rolle zu spielen.

Der unterschiedliche Signalweg und die Induktion von Apoptose durch Fenretinid sind mögliche Erklärungen für die Wachstumshemmung *All-trans*-Retinsäure resistenter Zellen durch Fenretinid.

Die Wachstumshemmung durch *All-trans*-Retinsäure beruht auf einer $RAR\alpha$ abhängigen Induktion von $RAR\beta$ mit nachfolgender Induktion und Sekretion von IGFBP-3. Die Induktion von $RAR\beta$ spielt dabei eine zentrale Rolle in verschiedenen Zell-Typen (Davis et al. 1993, Zhang et al. 1994, Liu et al. 1996). Auf die Bindung eines RAR/RXR Heterodimers an das β RARE-Element in der Promotor-Region des $RAR\beta$ Genes folgt die Induktion von $RAR\beta$ (de Thé et al. 1990, Hoffmann et al. 1990, Zhang et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die $RAR\beta$ Induktion bei Brust-Krebs Zell-Linien mittels eines $RAR\alpha$ abhängigen Signalweges erfolgt und eine Steigerung der IGFBP-3 Expression zur Folge hat (Shang et al. 1999). IGFBP-3 wiederum gilt als Vermittler der wachstumshemmenden Wirkung von *All-trans*-Retinsäure bei Brust-Krebs Zell-Linien (Gucev et al. 1996).

Dieses Model lässt sich wahrscheinlich auch auf Bronchialepithel-Zellen übertragen. Normale humane Bronchotracheal-Epithelzellen (NHBE) reagieren auf *All-trans*-Retinsäure mit einer Induktion von $RAR\beta$ mRNA und einer signifikanten Wachstumshemmung (Geradts et al. 1993). Unabhängig davon wird von einer $RAR\alpha$ abhängigen Induktion der IGFBP-3 Expression bei NHBE-Zellen durch *All-trans*-Retinsäure berichtet (Han et al. 1997).

Im Gegensatz zu den NHBE-Zellen zeigt sich bei vielen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien ein Verlust der $RAR\beta$ Induktion und eine fehlende Wachstumshemmung (Geradts et al. 1993, Zhang et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion von IGFBP-3 nach Stimulation mit *All-trans*-Retinsäure untersucht, da nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzell-Linien die mRNA von IGFBP 3 exprimieren und IGFBP-3 in das Wachstumsmedium sezernieren (Jaques et al. 1988, Reeve et al. 1992).

Es konnte gezeigt werden, dass die Wachstumshemmung der Zell-Linie A549 nach Stimulation mit *All-trans*-Retinsäure von einem deutlichen Anstieg der IGFBP-3 Sekretion in das Kulturmedium begleitet wird. Da keine Induktion der IGFBP-3 mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte ist anzunehmen, dass die IGFBP-3 Sekretion unabhängig von der Gene-Expression erfolgt. Die beiden Zell-Linien

EPLC-32M1 und LCLC-97TM1, deren Wachstum durch *All-trans*-Retinsäure nicht gehemmt werden konnte, zeigen dagegen nur eine minimale Steigerung der IGFBP-3 Sekretion. Da es eine Schwellendosis für die Wachstumshemmung durch IGFBP-3 gibt (Gucev et al. 1996) ist anzunehmen, dass die minimale Sekretionssteigerung hier für die Wachstumshemmung nicht ausreicht und somit eine mögliche Erklärung für die Resistenz der Zell-Linien gegenüber *All-trans*-Retinsäure darstellt.

IV.2.1 Bedeutung der RAR β -Induktion für die Wachstumshemmung durch Fenretinid

Einen Zusammenhang zwischen der Induktion von RAR β und der Wachstumshemmung durch Fenretinid konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Induktion von RAR β durch Fenretinid wurde erstmals in normalen Brustepithel-Zellen beschrieben (Swisshelm et al. 1994). Des Weiteren wird eine RAR β Induktion im Zusammenhang mit der Wachstumshemmung durch Fenretinid bei Zell-Linien gynäkologischer Tumore gezeigt (Sabichi et al. 1998). Dabei zeigen Fenretinid-sensible Zell-Linien mehr RAR β -Transkripte als Fenretinid-resistente Zell-Linien. Pergolizzi et al. zeigen eine RAR β Induktion durch Fenretinid in der Ovarial-Karzinomzell-Linie A2780 (Pergolizzi et al. 1999). Die Sensibilität gegenüber Fenretinid wird durch Überexpression von RAR β noch verstärkt. Im Gegensatz dazu bleibt auch nach Transfektion der RAR β negativen Ovarial-Karzinomzell-Linie IGROV-1 mit RAR β diese gegenüber der Wachstumshemmung durch Fenretinid resistent. Hierbei zeigt sich lediglich ein Anstieg der RAR β mRNA Transkripte und der endogenen RAR β mRNA, aber nicht des RAR β Proteins. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Produktion von RAR β Protein für die Wachstumshemmung durch Fenretinid nötig ist.

Bei Bronchialkarzinomzell-Linien sind die Ergebnisse unterschiedlich. Auch bei der Lungen-Adenokarzinomzell-Linie GLC82 wird die Wachstumshemmung durch Fenretinid von einer RAR β Induktion begleitet (Liu et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist bei 4 untersuchten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien (NCI-H157, NCI-H1792, NCI-H1648, NCI-H1944) keine Induktion von RAR β nach Inkubation mit Fenretinid über 24 h nachweisbar (Zou et al. 1998).

IV.2.2 Model des IGFBP-3 Signalweges

Die Rolle von IGFBP-3 für die Wachstumshemmung durch Fenretinid ist bisher noch nicht untersucht worden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Sekretion von IGFBP-3, die IGFBP-3 mRNA Expression sowie die immunzytochemische Färbung von IGFBP-3 im Zellkern nach Stimulation mit Fenretinid durchgeführt. An den Zell-Linien A549, EPLC-32M1 und LCLC-97TM1 konnte keine Steigerung der IGFBP-3 Sekretion in Zusammenhang mit der Wachstumshemmung durch Fenretinid festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in allen drei Zell-Linien eine Steigerung der IGFBP-3 mRNA Expression nach Stimulation mit Fenretinid. Darüber hinaus konnte eine Kumulation von IGFBP-3 Protein im Zellkern der Zell-Linie A549 beobachtet werden. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Wachstumshemmung durch Fenretinid über einen anderen Signalweg im Vergleich zu *All-trans*-Retinsäure abläuft. Ein mögliches Model dieses Signalweges gibt Abbildung 20 wieder.

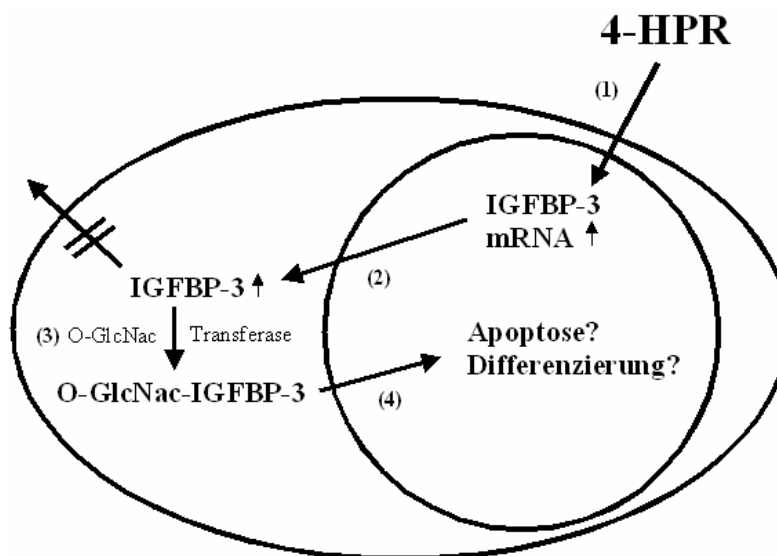


Abb. 20: Modell des Signalweges der Wachstumshemmung durch Fenretinid

Es konnte gezeigt werden, dass Fenretinid die mRNA-Expression des IGFBP-3 in den 3 getesteten Zell-Linien induziert. Mit dem Nachweis der fehlenden IGFBP-3 Protein-Sekretion und der Kumulation von IGFBP-3 im Zell-Kern der Zell-Linie A549 ist anzunehmen, dass der Steigerung der mRNA-Expression die IGFBP-3 Protein-Bildung

folgt (2) und das gebildete IGFBP-3 nicht sezerniert, sondern direkt in den Zell-Kern transloziert wird (4).

Sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in anderen Arbeiten konnte IGFBP-3 bereits im Zell-Kern verschiedener Zellen nachgewiesen werden (Jaques et al. 1997, Li et al. 1997, Wraight et al. 1998). IGFBP-3 besitzt ein Kern Lokalisations-Signal (NLS), welches homolog zu DNS-Bindungs Domänen anderer Transkriptionsfaktoren ist (Turner et al. 1989). Darüber hinaus bindet das im Kern der Zellen identifizierte IGFBP-3 weiterhin IGF-I (Jaques et al. 1997). Deshalb ist anzunehmen, dass die Translokation des IGFBP-3 in den Zell-Kern eine Rolle in der Vermittlung der Wachstumshemmung durch Fenretinid spielt. Offen bleibt, ob dabei die Bindung von IGF-I oder die IGF-unabhängige Regulation der Transkription bestimmter Gene Aufgabe des IGFBP-3 ist.

Da das im Kern lokalisierte IGFBP-3 das gleiche Molekulargewicht wie das sezernierte IGFBP-3 im konditionierten Medium hat (Jaques et al. 1997), setzen Schedlich et al. (Schedlich et al. 1998) eine Sekretion des IGFBP-3 der Internalisierung und dem Transport zum Zell-Kern voraus. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Sekretion nicht nachgewiesen werden und es ist anzunehmen, dass IGFBP-3 in diesem Fall wie andere Proteine, die für den Transport in den Zell-Kern bestimmt sind, einem intrakrinen Signalweg in den Zell-Kern folgt (Acland et al. 1990, Sullivan et al. 1993). Diese Vermutung wurde bereits von Rechler et al. Geäußert (Rechler et al. 1997).

Die Literatur gibt Hinweise darauf, dass der Translokation des IGFBP-3 (Schritt (4)) in den Zell-Kern der Schritt (3) des Signalweg-Modells mit einer O-ständigen Glykosylierung des IGFBP-3 vorgeschaltet ist. Zwei Eigenschaften von IGFBP-3 stimmen mit anderen Kern-Proteinen überein, die durch die O-GlcNAc Transferase glykosyliert werden. Diese O-GlcNAc Proteine, zu denen unter anderen p53, c-myc und viele Transkriptionsfaktoren gehören, kommen fast ausschließlich im Zell-Kern vor (Hart et al. 1997). Obwohl diese Proteine eine Vielfalt von Funktionen widerspiegeln, haben sie zwei gemeinsame Eigenschaften: 1. sie werden phosphoryliert und 2. sie formen reversible Komplexe mit anderen Polypeptiden, deren Bildung durch die Phosphorylierung reguliert wird (Hart et al. 1997). Neben einer möglichen O-ständigen Glykosylierung (Kelley et al. 1996) erfüllt IGFBP-3 die zwei genannten Eigenschaften. Zum einen wird es durch die Casein Kinase 2 phosphoryliert. Zum anderen formt IGFBP-3 mit IGF-I und einer säure-labilen Untereinheit (ALS) einen reversiblen Komplex. Die Bindung von IGFBP-3 an die Untereinheit und damit die Bildung des

Komplexes wird durch Phosphorylierung von IGFBP-3 behindert (Coverley et al. 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass das Wachstum der getesteten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien durch Fenretinid über diesen Signalweg gehemmt wird. Der Zusammenhang zwischen der Wachstumshemmung durch Fenretinid und einem intrakrinen Signalweg von IGFBP-3 ist neu und bietet eine mögliche Erklärung für die Unterschiede von Fenretinid und *All-trans*-Retinsäure in der Wachstumshemmung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomzell-Linien.

IV.2.3 Apoptose

Während bei *All-trans*-Retinsäure die Induktion von Differenzierung als Mechanismus für die Wachstumshemmung gilt, wird die Induktion von Apoptose für die Wachstumshemmung durch Fenretinid bei vielen Zell-Linien verantwortlich gemacht (Mariotti et al. 1994, Lotan et al. 1995, Fanjul et al. 1996, Formelli et al. 1996, Zou et al. 1998, Ulukaya et al. 1999). Die Induktion von Differenzierung scheint für die Wirkung von Fenretinid keine Rolle zu spielen (Formelli et al. 1996).

Ob Fenretinid bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien Apoptose induziert und ob Apoptose der Grund für die Wachstumshemmung durch Fenretinid ist, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des TUNEL-Assay untersucht. Durch die gleichzeitige Bewertung der zellulären Morphologie und der Lokalisation der Anfärbung degradierter DNS bietet der TUNEL-Assay eine sehr gute Möglichkeit, apoptotische Zellen zu identifizieren und die Apoptoserate zu quantifizieren. Dennoch wird die Aussagekraft des TUNEL-Assay durch sowohl falsch negative als auch falsch positive Ergebnisse limitiert. Obwohl die DNS-Fragmentierung als ein Merkmal der Apoptose gilt, ist sie nicht obligater Bestandteil der Apoptose. Daher kann die DNS-Fragmentierung in Zellen, die ansonsten morphologisch die Kriterien der Apoptose erfüllen, verspätet, nur teilweise oder gar nicht auftreten (Cohen et al. 1992, Collins et al. 1992). Auch bei nekrotischen Zellen kann DNS-Fragmentierung vorkommen und zu falsch positiven Ergebnissen im TUNEL-Assay führen (Collins et al. 1992). Des Weiteren kann nach Fixation der Zellen die Kernmembran durch mechanische Einflüsse

oder Proteasen durchlässig werden, so dass auch nicht-apoptotische Zellen im TUNEL-Assay angefärbt werden (Gal et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die TUNEL-positiven Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie der angefärbten DNS in verschiedene Gruppen eingeteilt und getrennt ausgezählt. Die Zellen mit den intrazellulären ringförmigen oder runden TUNEL-positiven Strukturen erinnern dabei stark an Zellen während der Zell-Teilung (Mitose). Auch die Zellen mit den parallel angeordneten länglichen TUNEL-positiven Strukturen könnten Zellen in der Anaphase der Zell-Teilung darstellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei Zellen, die sich im Prozess der Zell-Teilung befinden durch verschiedene Faktoren der programmierte Zell-Tod induziert werden kann. Die Apoptose konnte dabei in allen Stadien der Zell-Teilung induziert werden und die Zellen wurden im TUNEL-Assay positiv angefärbt. Im Lichtmikroskop wurden die TUNEL-positiven Zellen in die einzelnen Stadien der Zell-Teilung eingeteilt. (Sit et al. 1997, Swe et al. 1997, Swe et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden TUNEL-positive Zellen gefunden, die von der Morphologie Zellen in verschiedenen Stadien der Mitose gleichen. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob es sich bei diesen Zellen um einen programmierten Zelltod handelt oder ob unspezifische Proteasen nach der Fixation zur Anfärbung im TUNEL-Assay geführt haben. Daher wurden diese Zellen nicht in die Berechnung der Apoptose-Induktion durch Fenretinid einbezogen. Als eindeutig durch Fenretinid induzierte Apoptose wurden die TUNEL-positiven Zellen, die nach den Angaben des Herstellers (ENZO Diagnostics) die typische Braunfärbung TUNEL-positiver Zellen im Lichtmikroskop zeigen und die Morphologie von Interphase-Zellen haben (Yin et al. 1997). Die Apoptoserate nach Inkubation mit 10 µm Fenretinid steigt auf 5% im Vergleich zu <1% in der Kontrolle an. Die Apoptoserate von 5% erscheint sehr niedrig, um die Wachstumshemmung der Zell-Linie A549 durch Fenretinid auf ein Wachstum von 48% im Vergleich zur Kontrolle zu erklären. Dabei ist zu bedenken, dass durch Ablösen apoptotischer Zellen von den Zytozentrifugen-Präparaten ein falsch niedriges Ergebnis zustande kommen kann.

Neben der kritischen Bewertung der TUNEL-Assay Ergebnisse muss in Betracht gezogen werden, dass die Wachstumshemmung durch Fenretinid nur zum Teil durch eine Induktion von Apoptose erfolgt. Neben der Induktion von Apoptose wird auch eine differenzierende Wirkung von Fenretinid in der Literatur nicht ausgeschlossen. In der F9 Embryonal-Karzinom Zell-Linien konnte eine Induktion von Differenzierung durch Fenretinid nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Wild-Typ Zell-Linie F9 mit

1 μ M Fenretinid veränderten sich die Zellen zu einem primitiven endodermalen Phänotyp, der normalerweise nach Behandlung der Zellen mit All-*trans*-Retinsäure gesehen wird und durch eine gesteigerte Produktion von Laminin B1 und Kollagen Typ IV charakterisiert ist (Clifford et al. 1999). Daneben konnte nach Inkubation mit 10 μ M Fenretinid auch die Induktion von Apoptose bei diesen Zellen gezeigt werden. Die Induktion von Differenzierung war dabei abhängig vom Rezeptor-Status der Zell-Linien. Clifford et al. postulieren daher das Modell der Retinoid-Rezeptor abhängigen Induktion von Differenzierung durch niedrige Konzentrationen von Fenretinid sowie der Retinoid-Rezeptor unabhängigen Induktion von Apoptose bei höheren Konzentrationen (Clifford et al. 1999). Neben der Induktion von Apoptose und einer möglichen Induktion von Differenzierung durch Fenretinid kommt auch eine zytostatische Wirkung von Fenretinid für die Wachstumshemmung in Betracht. Fenretinid bewirkt in verschiedenen Zell-Linien einen Arrest der Zellen in der G1-Phase und am Übergang der G2-Phase zur Mitose (Igawa et al. 1994, Dipietrantonio et al. 1996, Zou et al. 1998). Die Versuche der vorliegenden Arbeit zur Reversibilität der Wachstumshemmung durch Fenretinid zeigen deutlich, dass Fenretinid auch zytostatisch auf Zellen wirkt, deren Proliferationsrate dann nach Entzug von Fenretinid wieder ansteigt.

Zwar können die Ergebnisse des TUNEL-Assay die Rolle der Apoptose-Induktion durch Fenretinid für die Wachstumshemmung nicht vollständig erklären, dennoch scheint die Apoptose eine Rolle dafür zu spielen. Darüber hinaus bieten die TUNEL-positiven Zellen mit der Morphologie mitotischer Zellen interessante Ansätze, die Apoptose-Induktion durch Fenretinid genauer zu untersuchen.

IV.3 Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Anwendung von Fenretinid

Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlangen Bedeutung für die klinische Anwendung von Fenretinid an Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Insbesondere sind dies folgende Ergebnisse der Arbeit:

- (1) Fenretinid hemmt dosisabhängig das Wachstum von 9 der 12 getesteten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien
- (2) Fenretinid hemmt das Wachstum All-*trans*-Retinsäure resistenter Zell-Linien
- (3) Die IC₅₀-Werte liegen zwischen 3,3 µM und >10,0 µM
- (4) Die Wachstumshemmung ist abhängig von der Serum-Konzentration
- (5) Die Wachstumshemmung ist reversibel
- (6) Die Zell-Linie A549 entwickelt unter Langzeitstimulation eine Resistenz gegenüber der Wachstumshemmung durch Fenretinid

Fenretinid erweist sich als ein potenter Wachstumsinhibitor in 9/12 der getesteten Zell-Linien. Darüber hinaus hemmt Fenretinid das Wachstum All-*trans*-Retinsäure resistenter Zell-Linien. Diese *in vitro* Ergebnisse müssen kritisch auf ihre Übertragbarkeit *in vivo* betrachtet werden. Es konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob Konzentrationen von Fenretinid in der Höhe der errechneten IC₅₀-Werte (3,3 µM - >10 µM) in Lungengewebe erreicht werden können. Bisher konnte eine Gewebekonzentration von 10 µM Fenretinid nur in Brustdrüsen-Gewebe nachgewiesen werden (Moon et al. 1979).

Die hohe Konzentration an Albumin und Wachstumsfaktoren im menschlichen Serum beeinflusst die Wirksamkeit von Fenretinid mehr als im getesteten *in vitro* System. Daher ist anzunehmen, dass *in vivo* höhere Plasma-Konzentrationen von Fenretinid nötig sind, um das Wachstum der Bronchialkarzinom-Zellen zu hemmen. Die Reversibilität der Wachstumshemmung erfordert darüber hinaus die Dauertherapie mit Fenretinid. Die Nebenwirkungen einer Langzeittherapie mit Fenretinid wurden bisher nur für eine Dosis von 200 mg/d über einen Zeitraum von 5 Jahren untersucht (Formelli et al. 1993a). Durch

Ausbildung von Resistenzen der Tumor-Zellen gegenüber Fenretinid ist bei Patienten mit Therapieversagern und raschen Rezidiv-Tumoren zu rechnen.

Die Übertragung der *in vitro* Ergebnisse *in vivo* erscheint schwierig. Erste *in vivo* Studien konnten die Ergebnisse der vielen *in vitro* Studien bisher nicht bestätigen. Die Tumor-Entstehung in der Lunge von weiblichen A/J Mäusen, in denen die Karzinogenese chemisch mit Tabak-Nitrosaminen induziert worden war, konnte durch Fenretinid nicht verhindert werden (Conaway et al. 1998). Auch in den ersten klinischen Studien bei Rauchern konnte Fenretinid Metaplasien, Dysplasien oder genetischen und phänotypischen Veränderungen der Lunge nicht zurückbilden (Kurie et al. 1999).

In einer Vielzahl klinischer Studien verschiedener Phasen wird derzeit die Wirksamkeit von Fenretinid in der Therapie epithelialer Tumore untersucht. Darunter ist auch eine Phase-II Studie an Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (Study ID Numbers 199/15645; CCUM-9940; NCI-T99-0112, NLM Identifier NCT00009971). In dieser Studie sollen die Raten kompletter und partieller Remissionen, die Dauer der Remission unter Fenretinid-Therapie und das Überleben der Patienten untersucht werden. Dabei erhalten die Patienten in Zyklen von 21 Tage Dauer 1800 mg/m² Fenretinid von Tag 1-7. Diese Dosis ist um ein Vielfaches höher als in den Langzeitstudien (200 mg/d), mit denen die gute Verträglichkeit von Fenretinid postuliert worden ist (Formelli et al. 1993a). Es bleibt abzuwarten, ob sich die gute Verträglichkeit von Fenretinid auch in dieser hohen Dosierung bestätigt. Auch die intermittierende Gabe von Fenretinid in dieser Studie erscheint in Kenntnis der Reversibilität der Wachstumshemmung wenig sinnvoll.

Inzwischen konnten bereits Retinamide wie das N-(2-carboxyphenyl)retinamid (2CPR) gefunden werden, die bei der Wachstumshemmung und Induktion von Apoptose bei Bronchialkarzinomzell-Linien *in vitro* effektiver sind als Fenretinid (Sun et al. 2001). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse *in vivo* mit der Etablierung einer neuen Therapie für Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wird aber weiterhin die schwierigste Aufgabe bleiben.

VII. Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit einem Bronchialkarzinom ist abhängig vom Stadium sehr schlecht und insgesamt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate aller Bronchialkarzinome bei 5-10%. Bei Diagnosestellung weisen 80% der Patienten ein lokal fortgeschrittenes oder fernmetastasiertes Tumor-Stadium (St.III/IV) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5-15% auf (Laack et al. 2000).

Bei der Suche nach neuen Therapie-Formen stellen die Retinoide, zu denen das Vitamin A und dessen natürliche und synthetische Derivate gezählt werden, eine interessante Substanz-Gruppe dar. Retinoide sind wichtig für eine Vielzahl physiologischer Vorgänge wie die Proliferation und Differenzierung epithelialer Gewebe, die Immunmodulation und die Embryonalentwicklung vor allem der Lunge. *All-trans*-Retinsäure, Hauptmetabolit des Vitamin A, hemmt das Wachstum von Zell-Linien verschiedenster Tumore und wird bereits in der Chemoprävention und Therapie maligner Tumore eingesetzt (Lotan et al. 1996). Dabei wird der Einsatz bei Patienten von der hohen Toxizität der *All-trans*-Retinsäure limitiert (Smith et al. 1992).

Viele Bronchialkarzinomzell-Linien dagegen sind resistent gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von *All-trans*-Retinsäure. Viel versprechend sind die bisherigen Ergebnisse mit Fenretinid [N-(4-hydroxyphenyl)retinamid, 4-HPR], einem synthetischen Amid der Retinsäure. Es konnte gezeigt werden, dass Fenretinid das Wachstum *All-trans*-Retinsäure resistenter Zell-Linien hemmt. Im Gegensatz zu *All-trans*-Retinsäure weist Fenretinid bei Langzeit-Therapie nur geringe Nebenwirkungen auf (Delia et al. 1993, Formelli et al. 1993a).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, (1) den Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien genauer zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Fenretinid das Wachstum von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien dosisabhängig hemmt. Auch bei *All-trans*-Retinsäure resistenten Zell-Linien erweist sich Fenretinid dabei als potenter Wachstumsinhibitor. Die Wachstumshemmung durch Fenretinid ist nach Entzug der Substanz reversibel und es konnten unter Langzeitstimulation mit Fenretinid Zellen kultiviert werden, die gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung resistent sind.

Des Weiteren sollte (2) die Rolle der Apoptose und die Bedeutung von IGFBP-3 für die Wachstumshemmung durch Fenretinid untersucht werden. Die Wachstumshemmung durch *All-trans*-Retinsäure beruht auf der Induktion von Differenzierung und IGFBP-3

gilt als Vermittler der Wachstumshemmung. Im Gegensatz dazu wird für die Wachstumshemmung durch Fenretinid die Induktion von Apoptose verantwortlich gemacht. Die Rolle von IGFBP-3 für die Wachstumshemmung durch Fenretinid ist bisher noch nicht untersucht worden.

Die Rolle der Apoptoseinduktion für die Wachstumshemmung durch Fenretinid konnte nicht eindeutig geklärt werden. Zwar konnte Apoptose-Induktion durch Fenretinid nachgewiesen werden, aber es ist anzunehmen, dass neben Apoptose auch die Induktion von Differenzierung und Zytostase für die Wachstumshemmung durch Fenretinid von Bedeutung sind.

Erstmalig konnte ein Zusammenhang der Wachstumshemmung durch Fenretinid und zwischen IGFBP-3 hergestellt werden. Fenretinid induziert die mRNA Expression von IGFBP-3. Im Vergleich zu *All-trans*-Retinsäure wird das IGFBP-3 Protein aber nicht in das Kultur-Medium sezerniert, sondern kumuliert im Zell-Kern. Es ist anzunehmen, dass IGFBP-3 anders als bei *All-trans*-Retinsäure einem intrakrinen Signalweg folgt und so die Wachstumshemmung durch Fenretinid vermittelt.

Zusammenfassend zeigt sich Fenretinid als ein potenter Wachstumsinhibitor nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomzell-Linien. Dabei ist die Wachstumshemmung von der Serum-Konzentration des Wachstumsmediums abhängig und es ist anzunehmen, dass *in vivo* höhere Serum-Konzentrationen für eine effektive Wachstumshemmung der Tumor-Zellen nötig sind. Darüber hinaus sprechen die Reversibilität der Wachstumshemmung und die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Fenretinid gegen den erfolgreichen Einsatz von Fenretinid in der Therapie von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Die Bedeutung des intrakrinen Signalweges von IGFBP-3 bringt ein neues Verständnis für die Wachstumshemmung durch Fenretinid und kann einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Retinoide darstellen, die besser als Fenretinid für die Therapie von Patienten mit einem Bronchialkarzinom geeignet sind.

V. Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| ALS | Acid Labile Subunit |
| ATRA | All- <i>trans</i> -Retinsäure |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase |
| GH | Growth Hormone |
| 4-HPR | Fenretinid, N-(4-hydroxyphenyl)retinamide |
| IC50 | Inhibitory Concentration 50% |
| IGF | Insulin-like Growth Factor |
| IGFBP | Insulin-like Growth Factor Binding Protein |
| MG | Molekular-Gewicht |
| MNU | N-methyl-N-nitrosourea |
| MPR | N-(4-methoxyphenyl)-all- <i>trans</i> -retinamide |
| mRNA | Messenger Ribonucleic Acid |
| NSCLC | Non-Small Cell Lung Cancer |
| O-Glc-NAc | O-linked-N-Acetylglucosamine |
| Pdt | Population Doubling Time |
| RAR | Retinoic-Acid-Receptor |
| RARE | Retinoic-Acid-Response-Element |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| RXR | Retinoic-X-Receptor |
| SCLC | Small Cell Lung Cancer |
| SPT | Second Primary Tumour |
| TNM | Tumor Nodulus Metastase |

VII. Literaturverzeichnis

- Abou-Issa H**, Webb TE, Minton JP, Moeschberger M (1989). Chemotherapeutic evaluation of of glucarate and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide alone or in combination in the rat mammary tumor model. *J Natl Cancer Inst* 47, 1820-1823
- Acland P**, Dixon M, Peters G, and Dickson C (1990). Subcellular fate of the int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon. *Nature* 343, 662-665
- American Cancer Society** (2001). Estimated new cancer cases and deaths by sex for all sites, United States: Cancer Facts and Figures-2001.
- Arnold AM**, Browman GP, Levine MN, D'Souza T, Johnstone B, Skingley P, Turner-Smith L, Cayco R, Booker L, Newhouse M (1992). The effect of the synthetic retinoid etrenitate on sputum cytology: results from a randomized trial. *Br J Cancer* 65, 737-743
- Avis I**, Mathias A, Unsworth EJ, Miller MJ, Cuttitta F, Mulshine JL, and Jakowlew SB (1995). Analysis of small cell lung cancer cell growth inhibition by 13-cis-retinoic acid: importance of bioavailability. *Cell Growth Differ* 6, 485-492
- Baxter RC** (1986) The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem* 25, 49-115
- Baxter RC**, Binoux M, Clemmons DR, Conover C, Drop SL, Holly JM, Mohan S, Oh Y, Rosenfeld RG (1998). Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *Endocrinology* 139, 4036
- Bepler G**, Jaques G, Neumann K, Aumuller G, Gropp C, and Havemann K (1987). Establishment, growth properties, and morphological characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 113, 31-40
- Bergh J**, Nilsson K, Zech L, and Giovanella B (1981): Establishment and characterization of a continuous lung squamous cell carcinoma cell line (U-1752). *Anticancer Res* 1, 317-322
- Bollag W** (1996) The retinoid revolution. *FASEB J* 10, 938-939
- Bundesministerium für Gesundheit** (2000). Drogen- und Suchtbericht 1999. *Bundesministerium für Gesundheit*
- Camerini T**, Mariani L, De Palo G, Marubini E, Di Mauro MG, Decensi A, Costa A, and Veronesi U (2001). Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer. *J Clin Oncol* 19, 1664-1670

- Center for Disease Control and Prevention** (2000). Death rates for malignant neoplasms of respiratory system, according to sex, detailed race, Hispanic origin, and age: United States, selected years 1950-1997. *Center for Disease Control and Prevention*
- Chytil F**, Riaz-ul-Haq (1990). Vitamin A mediated gene expression. *Eukaryotic Gene Expression* 1, 61-73
- Chytil F** (1996). Retinoids in lung development. *FASEB J* 10, 986-992
- Clifford JL**, Menter DG, Wang M, Lotan R, and Lippman SM (1999) Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 59, 14-18
- Cohen GM**, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286, 331-334
- Cohen KL**, Nissley SP (1976). The serum half-life of somatomedin activity: evidence for growth hormone dependence. *Acta Endocrinol (Copenh)* 83, 243-258
- Collins RJ**, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF (1992). Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *J Radiat Biol* 61, 451-453
- Conaway CC**, Jiao D, Kelloff GJ, Steele VE, Rivenson A, and Chung FL (1998) Chemopreventive potential of fumaric acid, N-acetylcysteine, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and beta-carotene for tobacco-nitrosamine-induced lung tumors in A/J mice. *Cancer Lett* 124, 85-93
- Coradini D**, Biffi A, Pellizzaro C, Pirronello E, Di Fronzo G (1997). Combined effect of tamoxifen or interferon-beta and 4-hydroxyphenylretinamide on the growth of breast cancer cell lines. *Tumor Biology* 18, 22-29
- Coverley JA**, Martin JL, Baxter RC (2000). The effect of phosphorylation by casein kinase 2 on the activity of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Endocrinology* 141, 564-570
- Daughaday WH** (1990). The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrinology* 127, 1-4
- Davis KD**, Lazar MA (1993). Induction of retinoic acid receptor β by retinoic acid is cell specific. *Endocrinology* 132, 1469-1474
- de Thé H**, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H, Dejean A (1990). Identification of a retinoic acid response element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature* 343, 177-180
- Delia D**, Aiello A, Lombardi L, Pelicci PG, Grignani F, Formelli F, Menard S, Costa A, Veronesi U (1993). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res* 53, 6036-6041

- Deutsche Krebsgesellschaft (2000).** Kleinzelliges Lungenkarzinom. 218 ff
- Deutsches Krebsforschungszentrum (2000).** Mortalität und Inzidenz des Bronchialkarzinoms in Deutschland. *Deutsches Krebsforschungszentrum*
- Dipietrantonio A, Hsieh TC, Wu JM (1996).** Differential effects of retinoic acid (RA) and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) on cell growth, induction of differentiation, and changes in p34cdc2, Bcl-2, and actin expression in the human promyelocytic HL-60 leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 873-842
- Dowlatschahi K, Mehta RG, Thomas CF, Dinger NM, Moon RC (1989).** Therapeutic effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on N-methyl-N-nitrosurea induced rat mammary cancer. *Cancer Lett* 47, 187
- Evans RM (1988).** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895
- Fanjul AN, Delia D, Pierotti MA, Rideout D, Qiu J, and Pfahl M (1996).** 4-Hydroxyphenyl retinamide is a highly selective activator of retinoid receptors. *J Biol Chem* 271, 22441-22446
- Favoni RE, de-Cupis A, Bruno S, Yee D, Ferrera A, Pirani P, Costa A, and Decensi A (1998).** Modulation of the insulin-like growth factor-I system by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 77, 2138-2147
- Follen M, Atkinson EN, Schottenfeld D, Malpica A, West L, Lippman S, Zou C, Hittelman WN, Lotan R, and Hong WK (2001).** A randomized clinical trial of 4-hydroxyphenylretinamide for high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Clin Cancer Res* 7, 3356-3365
- Formelli F, Clerici M, Campa T, Di Mauro MG, Magni A, Mascotti G, Moglia D, De Palo G, Costa A, Veronesi U (1993a).** Five-year administration of fenretinide: pharmacokinetics and effects on plasma retinol concentrations. *J Clin Oncol* 11, 2036-2042
- Formelli F, Cleris L (1993b).** Synthetic retinoid fenretinide is effective against a human ovarian carcinoma xenograft and potentiates cisplatin activity. *Cancer Res* 53, 5374
- Formelli F, Barua AB, and Olson JA (1996)** Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 10, 1014-1024
- Gal I, Varga T, Szilagyi I, Balazs M, Schlamadinger J, and Szabo G, Jr. (2000).** Protease-elicited TUNEL positivity of non-apoptotic fixed cells. *J Histochem Cytochem* 48, 963-970
- Gander RJ (1978).** All-trans retinoic acid esters and amides. U.S. patent 4,108,880. *Chem Abstr* 88, 89892

- Gazdar AF** (1986). Advances in the biology of non-small cell lung cancer. *Chest* 89, 277S-283S
- Gebert JF**, Moghal N, Frangioni JV, Sugarbaker DJ, Neel BG (1991). High frequency of retinoic acid receptor β abnormalities in human lung cancer. *Oncogene* 6, 1859-1868
- Geradts J**, Chen JY, Russell EK, Yankaskas JR, Nieves L, and Minna JD (1993). Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth Differ* 4, 799-809
- Giguere V**, Ong ES, Segui P, Evans RM (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629
- Gillies RJ**, Didier N, and Denton M (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159, 109-113
- Gucev ZS**, Oh Y, Kelley KM, and Rosenfeld RG (1996). Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid- and transforming growth factor β 2-induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Res* 56, 1545-1550
- Han GR**, Dohi DF, Lee HY, Rajah R, Walsh GL, Hong WK, Cohen P, and Kurie JM (1997). All-trans-retinoic acid increases transforming growth factor- β 2 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression through a retinoic acid receptor- α -dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 272, 13711-13716
- Hardouin S**, Hossenlopp P, Segovia B, Seurin D, Portolan G, Lassarre C, Binoux M (1987). Heterogeneity of insulin-like growth factor binding proteins and relationship between structure and affinity. 1. Circulating forms in man. *Eur J Biochem* 170, 121-132
- Hart GW** (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 315-335
- Heimbürger DC**, Alexander CB, Birch R, Butterworth CE Jr, Bailey WC, Krumdieck CL (1988). Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B12. Report of preliminary randomized, double-blind intervention trial. *JAMA* 259, 1525-1530
- Hoffmann B**, Lehmann JM, Zhang XK, Hermann T, Husmann M, Graupner G, Pfahl M (1990). A retinoic acid receptor-specific element controls the retinoic acid receptor β promoter. *Mol Endocrinol* 4, 1734-1743
- Hong WK** (1994). Retinoids and human cancer. *The Retinoids*, Raven Press, New York 597-658
- Hultin TA**, May CM, and Moon RC (1986). N-(4-hydroxyphenyl)-all-trans-retinamide pharmacokinetics in female rats and mice. *Drug Metab Dispos* 14, 714-717
- Hwa V**, Oh Y, Rosenfeld RG (1999). Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily. *Acta Paediatr Suppl* 428, 37-45

- Igawa M**, Tanabe T, Chodak GW, Rukstalis DB (1994). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces cell cycle specific growth inhibition in PC3 cells. *Prostate* 24, 299-305
- J Natl Cancer Inst** (2000). EDITOR'S NOTE: re: vitamin A analogue for breast cancer prevention: a grade of F or incomplete? *J Natl Cancer Inst* 92, 275
- Jaques G**, Rotsch M, Wegmann C, Worsch U, Maasberg M, Havemann K (1988). Production of immunoreactive insulin-like growth factor-1 and response to exogenous IGF-I in small cell lung cancer cell lines. *Exp Cell Res* 116, 336-340
- Jaques G**, Kiefer P, Schoneberger HJ, Wegmann B, Kaiser U, Brandscheid D, and Havemann K (1992). Differential expression of insulin-like growth factor binding proteins in human non-small cell lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 28A, 1899-1904
- Jaques G**, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, and Havemann K (1997). Nuclear localization of insulin-like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 138, 1767-1770
- Kelley KM**, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, and Rosenfeld RG (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 619-637
- Kueng W**, Silber E, and Eppenberger U (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182, 16-19
- Kurie JM** (1999) 4-Hydroxyphenylretinamide (4-HPR) in the reversal of bronchial metaplasia and dysplasia in smokers. *Proc Am Soc Clin Oncol* 18, 473a
- Kurie JM**, Lee JS, Khuri FR, Mao L, Morice RC, Lee JJ, Walsh GL, Broxson A, Lippman SM, Ro JY, Kemp BL, Liu D, Fritsche HA, Xu X, Lotan R, and Hong WK (2000). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in the chemoprevention of squamous metaplasia and dysplasia of the bronchial epithelium. *Clin Cancer Res* 6, 2973-2979
- Laack E** (2000). Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. *Deutsches Ärzteblatt* 97, A-373-A-384
- Lee JS**, Lippman SM, Benner SE, Lee JJ, Ro JY, Lukeman JM, Morice RC, Peters EJ, Pang AC, Fritsche HA Jr (1994). Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. *J Clin Oncol* 12, 937-945
- Li W**, Fawcett J, Widmer HR, Fielder PJ, Rabkin R, and Keller GA (1997). Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138, 1763-1766

- Lippman SM**, Lee JJ, Karp DD, Vokes EE, Benner SE, Goodman GE, Khuri FR, Marks R, Winn RJ, Fry W, Graziano SL, Gandara DR, Okawara G, Woodhouse CL, Williams B, Perez C, Kim HW, Lotan R, Roth JA, and Hong WK (2001). Randomized phase III intergroup trial of isotretinoin to prevent second primary tumors in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 93, 605-618
- Liu G**, Wu M, Levi G, and Ferrari N (1998). Inhibition of cancer cell growth by all-trans retinoic acid and its analog N-(4-hydroxyphenyl) retinamide: a possible mechanism of action via regulation of retinoid receptors expression. *Int J Cancer* 78, 248-254
- Liu Y**, Lee MO, Wang HG, Li Y, Hashimoto Y, Klaus M, Reed JC, Zhang X (1996). Retinoic acid receptor β mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 16, 1138-1149
- Lotan R** (1995). Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy. *J Natl Cancer Inst* 87, 1655-1657
- Lotan R** (1996). Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* 10, 1031-1039
- Lovat PE**, Irving H, Annicchiarico PM, Bernassola F, Malcolm AJ, Pearson AD, Melino G, and Redfern CP (1997). Apoptosis of N-type neuroblastoma cells after differentiation with 9-cis-retinoic acid and subsequent washout. *J Natl Cancer Inst* 89, 446-452
- Mariani L**, Formelli F, De Palo G, Manzari A, Camerini T, Campa T, Di Mauro MG, Crippa A, Delle Grottaglie M, Del Vecchio M, Marubini E, Costa A, Veronesi U and Formelli F (1996). Chemoprevention of breast cancer with fenretinide (4-HPR): study of long-term visual and ophthalmologic tolerability. *Tumori* 82, 444-449
- Mariotti A**, Marcora E, Bunone G, Costa A, Veronesi U, Pierotti MA, Della Valle G (1994). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: a potent inducer of apoptosis in human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 86, 1245-1247
- McCormick DL**, Rao KV, Dooley L, Steele VE, Lubet RA, Kelloff GJ, Bosland MC (1998): Influence of N-methyl-N-nitrosurea, testosterone, and N-(4-hydroxyphenyl)all-trans-retinamide on prostate cancer induction in Wistar-Unilever rats. *Cancer Res* 58, 3282-3288
- McKean-Cowdin R**, Feigelson HS, Ross RK, Pike MC, Henderson BE (2000). Declining cancer rates in the 1990s. *J Clin Oncol* 18, 2258-2268
- McLarty JW**, Holiday DB, Girard WM, Yanagihara RH, Kummet TD, and Greenberg SD (1995). Beta-Carotene, vitamin A, and lung cancer chemoprevention: results of an intermediate endpoint study. *Am J Clin Nutr* 62, 1431S-1438S
- Meyskens FL, Jr.** (2000). Re: Vitamin A analogue for breast cancer prevention: a grade of F or incomplete? *J Natl Cancer Inst* 92, 274-275

- Minniti CP**, Kohn EC, Grubb JH, Sly WS, Oh Y, Muller HL, Rosenfeld RG, and Helman LJ (1992). The insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-II-induced motility in human rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem* 267, 9000-9004
- Moon RC**, Kelloff GJ, Detrisac CJ, Steele VE, Thomas CF, Sigman CC (1992). Chemoprevention of MNU-induced mammary tumors in the mature rat by 4HPR and tamoxifen. *Anticancer Research* 12, 1147-1153
- Moon RC** (1994). Retinoids and cancer in experimental animals. *The Retinoids*, Raven Press, New York 573-595
- Moon RC**, Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Gander RJ, Newton DL, Smith JM, Phillips SL, Henderson WR, Mullen LT, Brown CC, Sporn MB (1979). N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res* 39, 1339-1346
- Moon RC**, Mehta RG (1989). Chemoprevention of experimental carcinogenesis in animals. *Prev Med* 18, 576-591
- Mukherjee R**, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, Nadzan AM, Paterniti JR Jr, Heyman RA (1997): Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386, 407-410
- Nervi C**, Vollberg TM, George MD, Zelent A, Chambon P, Jetten AM (1991). Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung cancer cells. *Exp Cell Res* 195, 163-170
- Nishimoto I**, Ohkuni Y, Ogata E, and Kojima I (1987). Insulin-like growth factor II increases cytoplasmic free calcium in competent Balb/c 3T3 cells treated with epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 142, 275-286
- Omenn GS**, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334, 1150-1155
- Pastorino U**, Infante M, Maioli M, Chiesa G, Buyse M, Firket P, Rosmentz N, Clerici M, Soresi E, Valente M (1993). Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *J Clin Oncol* 11, 1216-1222
- Pergolizzi R**, Appierto V, Crosti M, Cavadini E, Cleris L, Guffanti A, Formelli F (1999): Role of retinoic acid receptor overexpression in sensitivity to fenretinid and tumorigenicity of human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 81, 829-834
- Petkovich M**, Brand NJ, Krust A, Chambon P (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450
- Pfahl M** (1993). Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* 651-658

- Piantadosi S** (1999). Vitamin A analogue for breast cancer prevention: a grade of F or incomplete? *J Natl Cancer Inst* 91, 1794
- Pienta KJ**, Nguyen NM, Lehr JE (1993). Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res* 53, 224-226
- Rechler MM** (1997) Editorial: Growth inhibition by insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 - What's IGF got to do with it? *Endocrinology* 138, 2645-2647
- Reeve JG**, Brinkman A, Hughes S, Mitchell J, Schwander J, and Bleehe NM (1992). Expression of insulinlike growth factor (IGF) and IGF-binding protein genes in human lung tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 84, 628-634
- Rinderknecht E**, Humbel RE (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253, 2769-2776
- Robert-Koch-Institut** (2000). Mortalitätsraten des Lungenkrebses in Deutschland. *Robert-Koch-Institut*
- Rosenfeld, R. G. and Hintz, R. L.** (1986) In "The Receptors" *Academic Press, Orlando, Florida* 3, 281-329
- Rosenfeld RG**, Lamson G, Pham H, Oh Y, Conover C, De Leon DD, Donovan SM, Ocran I, and Giudice L (1990). Insulinlike growth factor-binding proteins. *Recent Prog Horm Res* 46:99-159; discussion 159-63, 99-159
- Roth RA** (1988). Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 239, 1269-1271
- Sabichi AL**, Hendricks DT, Bober MA, and Birrer MJ (1998). Retinoic acid receptor beta expression and growth inhibition of gynecologic cancer cells by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *J Natl Cancer Inst* 90, 597-605
- Schardt C**, Rotsch M, Erbil C, Goke R, Richter G, and Havemann K (1993). Characterization of insulin-like growth factor II receptors in human small cell lung cancer cell lines. *Exp Cell Res* 204, 22-29
- Schedlich LJ**, Young TF, Firth SM, and Baxter RC (1998). Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 18347-18352
- Shang Y**, Baumrucker CR, Green MH (1999). Signal relay by retinoic acid receptors a and b in the retinoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 274, 18005-18010
- Sit KH**, Yin L, and Paramanathan R (1997). Apoptotic condensations in M-phase cells. *Anat Rec* 248, 149-158
- Smith MA**, Parkinson DR, Cheson BD, and Friedman MA (1992). Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* 10, 839-864

- Sobin, L. H. and Wittekind, C.** (1997). UICC-TNM classification of malignant tumors. *Wiley&Sons*
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM** (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Federation Proceedings* 35, 1332-1338
- Sullivan PM, Wang YM, Joseph DR** (1993). Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of a messenger RNA encoding a protein with altered function. *Mol Endocrinol* 7, 702-705
- Sun SY, Yue P, Kelloff GJ, Steele VE, Lippman SM, Hong WK, and Lotan R** (2001). Identification of retinamides that are more potent than N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in inhibiting growth and inducing apoptosis of human head and neck and lung cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 595-601
- Supino R, Crosti M, Clerici M, Warlters A, Cleris L, Zunino F, and Formelli F** (1996). Induction of apoptosis by fenretinide (4HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression. *Int J Cancer* 65, 491-497
- Swanson B, Newton DL, Roller PP, Sporn MB** (1981). Biotransformation and biological activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide derivatives in rodents. *J Pharmacology Exp Therapeutics* 219, 632-637
- Swe M, Sit KH** (1997). Staurosporine induces telophase arrest and apoptosis blocking mitosis exit in human Chang liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 594-598
- Swe M, Sit KH** (2000). zVAD-fmk and DEVD-cho induced late mitosis arrest and apoptotic expressions. *Apoptosis* 5, 29-36
- Swishhelm K, Ryan K, Lee X, Tsou HC, Peacocke M, Sager R** (1994). Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ* 5, 133-141
- Swishhelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R** (1995). Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4472-4476
- Tallman MS** (1994). All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia and its potential in other hematologic malignancies. *Semin Hematol* 31, 38-48
- The Alpha-Tocopherol B-CCPSG** (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 330, 1029-1035

- Turner R**, Tjian R (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* 243, 1689-1694
- Ullrich A**, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5, 2503-2512
- Ulukaya E**, Wood EJ (1999). Fenretind and its relation to cancer. *Cancer Treatment Reviews* 25, 229-235
- Van Sandwijk N** (1999). Randomized trial of chemoprevention with vitamin A and N-acetylcysteine in patients with cancer of the upper and lower airways: the Euroscan study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 18, 464a
- Veronesi U**, De Palo G, Marubini E, Costa A, Formelli F, Mariani L, Decensi A, Camerini T, Del Turco MR, Di Mauro MG, Muraca MG, Del Vecchio M, Pinto C, D'Aiuto G, Boni C, Campa T, Magni A, Miceli R, Perloff M, Malone WF, Sporn MB (1999). Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1847-1856
- Veronesi U**, De Palo G, Marubini E, Costa A, Mariani L, Formelli F, and Decensi A (2000). Re: Vitamin A analogue for breast cancer prevention: a grade of F or incomplete? *J Natl Cancer Inst* 92, 274-275
- Vista-Picard N**, Hobbs PD, Pfahl M, Dawson MI, and Pfahl M (1996). The receptor-DNA complex determines the retinoid response: a mechanism for the diversification of the ligand signal. *Mol Cell Biol* 16, 4137-4146
- Wan H**, Dawson MI, Hong WK, and Lotan R (1997). Enhancement of Calu-1 human lung carcinoma cell growth in serum-free medium by retinoids: dependence on AP-1 activation, but not on retinoid response element activation. *Oncogene* 15, 2109-2118
- Warrell RP Jr** (1994). Applications for retinoids in cancer therapy. *Semin Hematol* 31, 1-13
- Willett WC**, MacMahon B (1984). Diet and cancer - an overview. *N Engl J Med* 310, 633-638
- Wolbach SB** (1933). Epithelial repair in recovery from vitamin A deficiency. *J Exp Med* 57, 511-526
- Wraight CJ**, Liepe IJ, White PJ, Hibbs AR, and Werther GA (1998). Intranuclear localization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) during cell division in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111, 239-242
- Yarden Y**, Ullrich A (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57:443-78., 443-478

- Yin L**, Sit KH (1997). Micrococcal nuclease (endonuclease) digestion causes apoptosis and mitotic catastrophe with interphase chromosome condensation in human Chang liver cells. *Cell Death Differ* 4, 796-807
- Zelen M** (1973). Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 3 4, 31-42
- Zhang XK**, Liu Y, Lee MO, and Pfahl M (1994). A specific defect in the retinoic acid response associated with human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 54, 5663-5669
- Ziv Y**, Gupta MK, Milsom JW, Vladisavljevic A, Brand M, Fazio VW (1994). The effect of tamoxifen and fenretinide on human colorectal cancer cell lines in vitro. *Anticancer Research* 14, 2005-2009
- Zou CP**, Kurie JM, Lotan D, Zou CC, Hong WK, and Lotan R (1998) Higher potency of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide than all-trans-retinoic acid in induction of apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 4, 1345-1355

IX. Anhang

Meine Hochschullehrer an der Philipps-Universität Marburg waren:

Prof. Dr. G. Aumüller, Prof. Dr. R. Arnold, Prof. Dr. Dr. H-D. Basler, Prof. Dr. E. Baum, Prof. Dr. P. J. Barth, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. M. O. Doss, Prof. Dr. P. Engel, Prof. Dr. A. Geus, Prof. Dr. L. Gotzen, Prof. Dr. A. Habermehl, Prof. Dr. P. Griss, Prof. Dr. H-J. Gröne, Prof. Dr. R. Happle, Prof. Dr. R. Hofmann, Prof. Dr. H. F. Kern, Prof. Dr. H-D. Klenk, Prof. Dr. J. Koolman, Prof. Dr. J-C. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. R. E. Lang, Prof. Dr. H. Lennartz, Prof. Dr. W. H. Oertel, Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt, Prof. Dr. D-O. Schachtschabel, Prof. Dr. H. Schäfer, Prof. Dr. C. Reichardt, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. K-D. Schulz, Prof. Dr. Seyberth, Prof. Dr. E. Weihe, Prof. Dr. Werner, Prof. Dr. K. Voigt,

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. G. Jaques für Ihre Anregungen zu dieser Arbeit und die intensive Betreuung während der Durchführung. Sie hat sich stets viel Zeit für meine Fragen genommen und war immer offen für neue Ideen. Frau Jaques hat mir in zahlreichen Diskussionen vermittelt, Ergebnisse wissenschaftlicher Arbeit immer zu hinterfragen und erst dann Schlussfolgerungen daraus zu ziehen, was für mich den Grundstein sinnvoller Forschung darstellt.

Außerdem möchte ich Christine Jung danken, die parallel zu mir mit kleinzelligen Bronchialkarzinomzell-Linien arbeitete. Mit gegenseitiger Unterstützung und kritischer Diskussion der Ergebnisse haben wir hilfreiche Anregungen für die eigenen Arbeiten finden können.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Laborbereiches der Abteilung. Besonders danke ich Cordula Loechelt und Almut Wachtel, die den organisatorischen Rahmen zu meiner Arbeit gestellt haben. Darüber hinaus danke ich Dr. Renate Hochscheidt für die Hilfe bei der immnzytochemischem IGFBP-3 Färbung und der IGFBP-3 RT-PCR. Kathleen Dörsch, Dr. Manuel Schmidt und Dr. Markus Ritter danke ich für wertvolle Anregungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie für die Durchführung der PCR-Versuche.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken. Sie haben mich während des gesamten Studiums der Humanmedizin und während der Arbeit zu meiner Promotion unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss von Fenretinid auf das Wachstum nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinomzell-Linien und Bedeutung des IGF Bindungs-Protein 3“ im Med.Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie unter Leitung von Prof. Dr. A. Neubauer mit Unterstützung durch Frau PD Dr. G. Jaques ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Is Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in Lung Cancer Cell Lines by Fenretinide [N-(4-hydroxyphenyl)retinamide] Sufficient for Cancer Therapy?

Int J Cancer 2002 Aug 10;100(5):520-6.

Fenretinide inhibits growth in non-small cell lung cancer cell lines independent of its regulation of IGFBP-3

Ohlmann C-H, Jung C, Jaques G

J Cancer Res and Clin Onc Vol 125; No 2 (1999); Suppl S83

Induction of Apoptosis by Fenretinide (4HPR) in Human Lung Carcinoma Cells Shows Higher Potency than all-trans-retinoic acid.

G. Jaques, C. Jung, C-H. Ohlmann, B. Reckzeh, K. Noll, M. Wolf, A. Neubauer

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und

Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und

Onkologie

Jena 1999

Marburg, den 28.11.2002